Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. Franke

Aktivitätsänderungen der Enzyme M D H, I C D H, G O T und G P T in der Rattenleber nach oraler Gabe des organotropen Carcinogens N-Nitrosomorpholin

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Jürgen Brünger

16. Dezember 1971

1972

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Franke

Aktivitätsänderungen der Enzyme M D H, I C D H, G O T und G P T in der Rattenleber nach oraler Gabe des organotropen Carcinogens N-Nitrosomorpholin

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Jürgen Brünger

16. Dezember 1971

Referent: Privat-Dozent Dr. med. H. H a u g

Korreferent: Professor Dr. med. H. F r a n k e

Dekan: Professor Dr. med. K. - H. W e i s

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 2. 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

M E I N E N E L T E R N

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
III.	MATERIAL UND METHODIK	14
	1. Versuchstiere	14
	2. Gruppenbildung und Chemikalien	15
	3. Versuchsdurchführung	16
	4. Enzymaktivitätsmessungen	17
	5. Berechnungen der Enzymaktivitäten	2o
	6. Statistik	21
	7. Klassifizierung der erhobenen Befunde	22
IV.	VERSUCHSERGEBNISSE	25
	Erläuterung der Abkürzungen	26
	Tabellen und Diagramme	27
V.	DISKUSSION	61
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	65
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	67

I. E I N L E I T U N G

Die Carcinogenese führt zu gewissen Veränderungen im Stoffwechsel der betroffenen Zellen. Als klassischer Befund kann die Beobachtung von Otto Warburg gelten, der schon 1926 feststellte, daß in Tumorzellen ein Gärungsstoffwechsel abläuft. (3)

Im Laufe der Zeit wurden sehr viele Einzelbeobachtungen über veränderte Stoffwechselabläufe in Krebszellen beschrieben. Bis heute lassen sich aber diese Beobachtungen noch nicht zu einem allgemein akzeptierten Bild der Cancerogenese zusammenfügen. Wie wir im folgenden Kapitel noch ausführlicher skizzieren, können die verschiedenen Umwelteinflüsse - wie Röntgen-Strahlen, UV-Strahlung, Viren und bis heute etwa 500 verschiedene chemische Substanzen - zu cancerösen Zellentartungen führen. Immer wieder haben Fortschritte auf Teilgebieten der Biochemie zu neuen Studienansätzen über die Cancerogenese geführt. So hat die Aufklärung der Stoffwechselwege der RNS und DNS die Informationshypothese hervorgerufen. Nach dieser Hypothese beeinflussen die cancerogenen Substanzen die RNS entweder im Kernmaterial oder auf der Ebene der Ribosomen. Die RNS ist aber auch der genetische Informationsträger, auf dessen Inhalt die Zelle bei der Synthese von Enzymprotein zurückgreifen muß. Nach unseren heutigen Vorstellungen ist die Synthese von Enzymen

streng genetisch geregelt. Wahrscheinlich unterliegt auch die Ausprägung einer gewebsspezifischen Enzymaktivität der genetischen Regulation durch die sogenannten Regulatorgene.(42)

Eine so tiefgreifende Änderung wie die Cancerisierung, die den Verlust der Steuermechanismen der Zelle hervorruft, müßte sich auch in einer Änderung der Metabolitenbahnen und damit auch der Stoffwechselwerkzeuge der betroffenen Zellen ausdrücken. Voraussetzung hierfür wäre die Beeinträchtigung der Stoffwechselwege und ein begrenzender Einfluß der Enzyme.

In früheren Arbeiten unseres Labors wurde die biologische Regelbreite verschiedener Enzymaktivitäten in Lebergeweben von Wistar Inzuchtratten unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Es lag nahe, auch den Einfluß der Cancerisierung auf diese Enzymaktivitäten zu studieren. Wir haben deshalb mit Hilfe eines bekannten Cancerisierungsmodells der Leber Aktivitätsstudien von einigen Enzymen der Transaminierung und des Zitronensäurecyclus untersucht. Parallel zu dieser Arbeit wurde die Bestimmung weiterer Enzymaktivitäten auch anderer Stoffwechselketten vorgenommen.

Die vorgelegte Arbeit soll zu diesen Problemen einen Beitrag leisten.

II. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

A. Die verschiedenen Typen von Karzinogenen.

Die Ursachen, die zur Kanzerisierung führen, sind bis heute Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen. Es hat sich gezeigt, daß endogene und exogene Faktoren in der Krebsentstehung vielfach zusammenwirken, wobei die exogenen Faktoren quantitativ überwiegen sollen. Man kann folgende Einteilung der Karzinogene treffen (HECKER) :

I. Physikalische Faktoren
   a) Röntgenstrahlen
   b) UV-Strahlen
   c) ionisierende Strahlen

II. Chemische Faktoren
   a) anorganische Verbindungen
      (z. B. Chromat, Asbest, arsenhaltige Chemikalien)
   b) organische Verbindungen, zahlenmäßig die größte Gruppe karzinogener Agentien. (9, 1o)
   c) krebserzeugende Virusarten.

Die Gruppe der chemischen Karzinogene umfaßt heute über 5oo verschiedene Substanzen. Die Vielfalt im chemischen Aufbau, in der Molekülgröße und in den chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser Agentien ist besonders groß. Die Karzinogene reichen von reinen Elementen

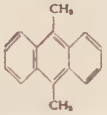
und einfachen anorganischen Verbindungen, wie Ni, Co, Chromaten und Arsenoxiden, über kleinmolekulare Stoffe (Urethan, Nitrosamine, Lostverbindungen) und polycyclische Kohlenwasserstoffe bis hin zu hochpolymeren Verbindungen. (HECKER)

Es ist z. Zt. noch nicht möglich, für alle diese Substanzen eine gemeinsame physikalische und chemische Basis für ihre cancerogene Wirksamkeit aufzuzeigen, so daß mit differenzierter intrazellulärer biochemischer Wirkungsweise gerechnet werden muß, die jedoch zum gleichen Endresultat, nämlich zur Umwandlung normaler Zellen in Tumorzellen führt. (24)
Unter Verwendung chemischer Karzinogene in Tierversuchen wurden wichtige Erkenntnisse im Hinblick auf den Mechanismus der Geschwulstbildung gewonnen.

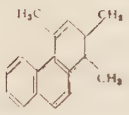
Von den organisch chemischen Karzinogenen wurden die hauptsächlichen Gruppen von GRAFFI wie folgt zusammengestellt. (21)

1. Die krebserzeugende polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe sind dadurch gekennzeichnet, daß sie lokal am Ort ihrer Applikation Tumoren erzeugen. Die einfachste Verbindung dieses Typs, mit allerdings schwacher Wirkung, leitet sich von Anthracen und Phenanthren ab.

9, 1o -Dimethylanthracen und 1,2,4-Trimethylphenanthren (s. Abb. 1)



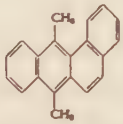
9,10-Dimethyl-anthracen



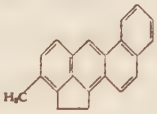
1,2,4-Trimethylphenanthren

Abb. 1
Die einfachsten krebserzeugenden Kohlenwasserstoffe (nur schwach wirksam)

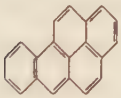
Die wichtigsten Verbindungen dieses Typs leiten sich von tetracyclischen Kohlenwasserstoffen durch Methylsubstitution oder Angliederung weiterer Ringe ab. 9,1o-Dimethyl-1,2-benzanthranen, 3-Methyl-cholanthren, 3,3-Benzpyren und 2-Methyl-3,4-benzphenanthren (s. Abb. 2) (32)



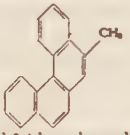
9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracen



3-Methyl-cholanthren



3,4-Benzpyren

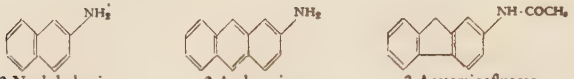


2-Methyl-3,4-benzphenanthren

Abb. 2
Die wichtigsten krebserzeugenden Kohlenwasserstoffe

2. Kennzeichnend für die krebserzeugenden aromatischen Amine ist ihre resorptive Wirkung und ihre Spezifität

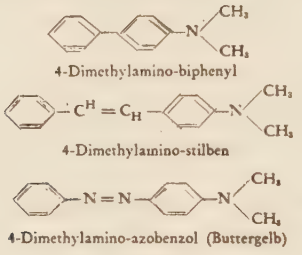
zu bestimmten Organen. Zu dieser Klasse von Verbindungen gehören k o n d e n s i e r t e a r o m a t i s c h e A m i n e , wie 2-Naphthylamin, 2-Anthramin und 2-Acetaminofluoren (s. Abb.3).



2-Naphthylamin 2-Anthramin 2-Acetaminofluoren

Abb. 3
Krebserzeugende kondensierte aromatische Amine

Auch lineare aromatische Amine, wie 4-Dimethylaminobiphenyl, 4-Dimethylamino-stilben und 4-Dimethylaminoazobenzol (Buttergelb) zählen zu dieser Gruppe von Verbindungen. (s. Abb. 4) (35)



4-Dimethylamino-biphenyl

4-Dimethylamino-stilben

4-Dimethylamino-azobenzol (Buttergelb)

Abb. 4
Krebserzeugende lineare aromatische Amine (aus GRAFFI)

(21)

3. Eine dritte Gruppe von krebserzeugenden Verbindungen besitzt das gemeinsame chemische Kennzeichen, alkylierend zu wirken. Man faßt diesen Typ daher zusammen in der Gruppe der alkylierend wirkenden Verbindungen; z. B. Stickstoff-Lost, N-Acyl-äthyleminine,

Butadien-diepoxyd und Urethan (s. Abb. 5)

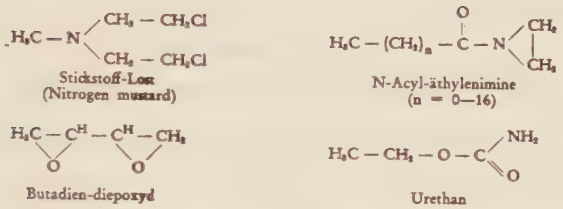


Abb. 5
Krebserzeugende alkylierende Verbindungen und Urethan

(nach GRAFFI)(21)

Diese Verbindungen erzeugen Krebs nach Injektion an der Injektionsstelle.
Die letztgenannte Gruppe steht in engem Zusammenhang zu den N-Nitrosoverbindungen. In ihrem biochemischen Reaktionsablauf zeigen sie nach den Ergebnissen von M A G E E eine Alkylierung von Nucleinsäuren, die als wahrscheinlicher Mechanismus der carcinogenen Primärwirkung auf molekulare Ebene anzusehen ist.
Dieser Mechanismus wurde übersichtlich von D R U C K - R E Y , P R E U S S M A N N et al. (18) dargestellt.

B. Cancerogene Wirkung von N-Nitrosoverbindungen.

Im Jahre 1956 berichteten MAGEE und BARNES (4o) über die Erzeugung von Leberkrebs nach Verfütterung von Nitrosodimethylamin bei Ratten.
Bestätigt wurden die Angaben von MAGEE und BARNES durch SCHMÄL und PREUSSMANN im Jahre 1959, wobei diese Autoren besonders auf die Organotropie (hepatotrop) hinwiesen. 196o berichteten die gleichen Autoren über die leberkrebserzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten. (56)
Die Autoren HOFFMANN und GRAFFI berichteten 1964 über eine Kanzerogenese mit Diäthylnitrosamintropfung der Mäusehaut, welche selektiv zu Nasennebenhöhlentumoren führte. (28)
Weitere Berichte mit ausgedehnten Literaturangaben über chemische Konstitution und carcinogene Wirkung bei Nitrosaminen liegen von den Autoren DRUCKREY, PREUSSMANN, SCHMÄL und MÜLLER vor. (13)
Im Jahre 1967 berichteten diese Autoren über die organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen. Hier wurde auch über ein sehr starkes und ungewöhnlich schnell wirkendes Carcinogen für die Leber berichtet, das N-Nitroso-morpholin (D/letal o,7 gr/kg).

Im Rahmen weiterer systematischer Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution

von Nitrosaminen und ihrer krebserzeugenden Wirkung wurden von DRUCKREY, IVANKOVIC, MENNEL und PREUSSMANN auffallend viele selektive Wirkungen beobachtet. Symmetrische Dialkylnitrosamine erzeugten bei dauernder oraler Gabe an Ratten fast nur Leberkrebs (DRUCKREY et al.) Dibutyl-nitrosamin dagegen meist Carcinome der Blase. Die unsymmetrischen Methyl- und Äthyl - alkyl - nitrosamine führten meist selektiv zu Carcinomen des Pharynx und der Speiseröhre (DRUCKREY et al.) sowohl bei oraler als auch bei intravenöser Applikation. Nitrosopyrrolidin und Nitrosomorpholin im Trinkwasser gegeben erzeugten Leberkrebs. In weiteren Versuchen zeigte sich, daß nicht nur die chemische Konstitution des Cancerogens, sondern auch seine Applikationsart von Bedeutung für die "Organotropie" der Carcinogenese war. So führte z. B. die orale Gabe von Diamylnitrosamin zu Leberkrebs, die subkutane Gabe zu Lungenkrebs. (DRUCKREY et al.) (14, 15, 16, 17)

Weitere Untersuchungen über die cancerogene Wirkung und Organotropie von Nitrosaminen wurden von SCHMÄL und THOMAS gemacht. (57)
Diese Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß nicht nur die chemische Struktur und die Applikationsart des Cancerogens sondern auch die verwendete Tierart auf die Organotropie einen entscheidenen Einfluß hat.

Es gibt in der Literatur noch eine Reihe von Autoren, die unter dem Gesichtspunkt der Carcinogenese, der Organotropie, der Dosis, dem Zeitfaktor und der Morphologie der entstandenen Tumoren über Versuche mit Nitrosaminen berichten. (6, 11, 22, 25, 26, 31, 34, 36, 38, 44, 51, 53, 54, 55, 6o, 61, 62)

C. Enzymaktivitätsänderungen während der Carcinogenese mit N-Nitrosomorpholin, unter besonderer Berücksichtigung der Enzyme MDH, ICDH, GOT und GPT.

In den vorhandenen Literaturstellen zu diesem Thema finden sich zum Teil sehr widersprechende Ergebnisse. Zum großen Teil sind diese Ergebnisse auf sehr unterschiedliche Techniken und zum Teil auf die Außerachtlassung der genetischen Unterschiede der Versuchstiere zurückzuführen. Bei Untersuchungen zu diesem Thema sollte immer am gleichen Tier-Inzuchtstamm gearbeitet werden, weil die Ergebnisse sonst durch eine zweite Variable beeinflußt werden.

M D H

Die Autoren HOU und REES berichteten über einen Abfall der Konzentration des Enzyms MDH in der Rattenleber (29) während der Tumorinduktion mit Acetaminofluoren, wenn das Bezugssystem das Gewebenaßgewicht war. Beim Wechsel des Bezugssystems jedoch war kein Unterschied mehr in der Enzymkonzentration zur normalen Rattenleber feststellbar. Die MDH Aktivität fiel in langsam wachsenden Tumoren um 15 - 3o % ab (5123 D und 78oo),

in mittelschnell wachsenden Tumoren annähernd um 3o % und in schnell wachsenden um 7o % bezogen auf den Normalwert der Kontrollgruppe = 1oo %.
Es hat den Anschein, daß der Abfall der MDH Aktivität sich mit ansteigender Geschwindigkeit des Tumorwachstums korrelieren läßt. Allerdings sind alle diese Versuche mit transplantierten Tumoren gemacht worden. Diese haben ein völlig verschiedenes genetisches Material und die Aussagen sind entsprechend zu bewerten. (27, 63)

ICDH

Die Autoren WOLFSON et al. und STERKEL et al. berichteten 1958, daß der Gehalt der ICDH bei Krebskrankheiten mit Metastasen in der Leber erhöht ist. BODANSKI (1961) berichtete über einen markanten Anstieg der Serum ICDH bei Patienten in der Endphase eines stark metastasierenden Lebertumors. (12)

GOT und GPT

Die Autoren ALLARD und DE LAMIRANDE kamen zu der Auffassung, daß Enzymaktivitäten in Lebertumoren, die sehr niedrig oder fast zu "fehlen scheinen" zu einer Gruppe von möglichen Anzeichen gehören, wie sie in der präcancerösen experimentellen Lebercarcinogenese auftreten. (2)
Untersucht wurde das Verhalten von drei Aminotransferasen, GDH, GPT und GOT im Novikoff Hepatom. In diesem Tumor wurden nur sehr niedrige oder "fehlende Aktivitäten" gefunden. Im Gegensatz dazu konnten während der

Carcinogenese mit Buttergelb die Enzymaktivitäten von GPT und GOT immer in der Leber nachgewiesen werden. Ferner wurde der Versuch gemacht, quantitativ die Größen der Enzymaktivitäten von Leberhomogenaten in Beziehung zu histologischen Veränderungen während der Azo-Farbstoff-Fütterung zu setzen. Ergebnisse dieser Analyse lassen daran denken, daß die Leberenzyme GDH, GOT und GPT sich nicht spezifisch ändern, bevor Tumormassen in der Leber auftraten. Jede Aktivitätsänderung der Enzyme in der "präcancerösen Leber" scheint die Folge eines Wechsels in der Zellpopulation zu sein, oder ist in der Anzahl der Mitochondrien zu suchen. In primären Lebertumoren, die eine gleichartige Zellpopulation aufweisen, konnte eine GPT Aktivität nicht gezeigt werden, wohingegen die GOT eine sehr niedrige Aktivität aufwies. (19,43)
DYER et al. (19) konnten zeigen, daß die GOT Aktivität des Hepatoms 5123 etwa 2 - 5mal so hoch war wie in der normalen Leber. Alle anderen Lebertumoren zeigten weitaus niedrigere Werte. (s. Tabelle)

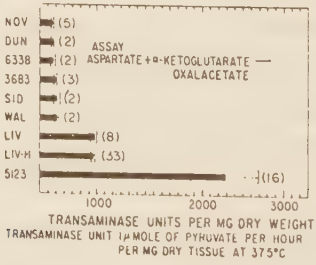


Fig. 14 Transaminase activity of liver and of transplanted tumors. NOV Novikoff, DUN – Dunning LC-18, 6338 mammary tumor, 3683 and 5123 hepatomas, Sid – Sidransky hepatoma, Wal – Walker carcino-sarcoma, LIV – liver, LIV-H – Liver of host bearing hepatoma 5123. From Dyer *et al.* (1961).

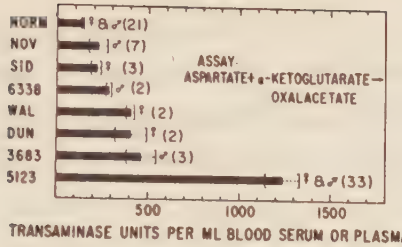


CHART 2.—Transaminase activity of sera or plasma of rats with and without tumor transplants. Transaminase unit: the amount of enzyme (GOT) that will cause the reading at 340 mμ to decrease at the rate of 0.001 O.D. units per minute per centimeter light path at 25° C. under the described conditions. Average values, with range of standard error in brackets. Number of rats in each group in parentheses.

Auch hier ist zu bedenken, daß die Transplantattumoren mit einem anderen genetischen Material auch andere Enzymaktivitätsdaten enthalten können.
COHEN et al. berichteten schon 1942, daß schnell wachsende Lebertumoren sehr niedrige GOT Aktivitäten haben. Während der Carcinogenese mit Buttergelb fiel die GOT Aktivität in den untersuchten Rattenlebern ab. In den später entstandenen Lebertumoren fielen die GOT Werte sogar auf ein Drittel der ursprünglichen Aktivitätswerte ab. Alle aufgeführten Tumoren zeigen eine ähnliche GOT Aktivität, die sehr viel niedriger liegt als die von normalen Lebern, ausgenommen das Hepatom 5123, welches in krassem Gegensatz zur normalen und anderen Tumorlebern eine weitaus höhere Aktivität aufweist. Die GOT Aktivität im Serum oder Plasma von Tumortieren war etwas erhöht im Vergleich zum Serum gesunder Tiere. Auch hier macht das Hepatom 5123 eine Ausnahme mit sehr hohen Aktivitätswerten im Serum.
(s. obere Tabelle)

Aus diesen wenigen Zitaten über die Aktivitäten der hier untersuchten Enzyme, die wir nach eingehender Suche in der Literautr gefunden haben, geht hervor, wie gering unsere Kenntnisse auf diesem Gebiet noch sind.

III. Material und Methodik

1. Versuchstiere.

Für unsere Versuche verwandten wir männliche Inzuchtratten vom Wistarstamm B 47, die wir aus einer Labortierzucht bezogen hatten, die ihre Tiere über mehr als 1o Jahre durch ständiges Kreuzen verwandter Tiere fortzüchtet. Das Gewicht der Tiere betrug zwischen 14o - 16o gr. bei Versuchsbeginn. Ernährt wurden die Tiere mit Altromin R-15 und Leitungswasser ad libitum. Die Tiere wurden 14 Tage lang an ihre neue Umgebung gewöhnt, bevor wir mit den Versuchen begannen. Der Raum, in dem die Tiere gehalten wurden, hatte eine Temperatur von etwa 2o - 23 °C. Um eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch Koprophagie zu verhindern, wurden die Tiere in Zuchtkäfigen mit Gitterboden gehalten. Wir verwandten insgesamt 17o Inzuchtratten für unsere Versuche. (7)

2. Gruppenbildung und Chemikalien.

Von den 17o Ratten, die zu unseren Versuchen herangezogen wurden, verwandten wir 15 Tiere für Vorversuche, 55 Tiere wurden als Kontrollgruppe gehalten und 1oo Tiere wurden mit dem Carcinogen N-Nitrosomorpholin getränkt. In konstanten Abständen von 1o Tagen wurden jeweils die Untersuchungen durchgeführt. An jedem Versuchstag wurden 15 Tiere zu unseren Messungen herangezogen. Im Trinkwasser von 1o Tieren unserer Versuchsgruppe war immer N-Nitrosomorpholin enthalten gewesen, die anderen 5 Tiere hatten Leitungswasser ad libitum bekommen und bildeten jeweils unsere Kontrollgruppe. Für die Versuchsgruppen wurde täglich eine Lösung, die 12 mg/1oo ml N-Nitrosomorpholin enthielt, hergestellt. Die jeweils getrunkene Menge der NNM-Lösung wurde durch Wiegen der verbleibenden Restmenge festgestellt und auf die im Käfig vorhandenen Tiere umgerechnet. Zur Orientierung über den rein toxischen Effekt des NNM auf die Leber haben wir bei wenigen Tieren 1o Tage vor Tötung das NNM aus dem Trinkwasser weggelassen. Die Zahl der Tiere ist aber so gering, daß auf diese Versuche nicht weiter eingegangen werden kann. Wir haben uns lediglich auf die Wiedergabe der Meßergebnisse beschränkt.

3. Versuchsdurchführung.

a. Vorversuche.

In Vorversuchen wurden an 15 Ratten die Einzelphasen des Hauptversuchs durchgeführt. Narkosetechnik, Operations- und Spülmethode und die Labortechnik der Enzymaktivitätsbestimmung wurden geübt. Ferner wurden die günstigsten Organhomogenatsverdünnungen für die Messung der zu untersuchenden Enzyme bestimmt.

b. Hauptversuche.

Die Tiere wurden mit Äther narkotisiert, da dieser nicht hepatotoxisch wirken soll. (33)
Im Anschluß daran wurden die Tiere gewogen und auf einem Operationsbrett fixiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde ein äthergetränkter Gazestreifen in einem Erlenmeyer-Kolben verwendet, der den Tieren über den Kopf gestülpt wurde. Die Operation der Tiere und die angewandte Methode der Leberspülung wurden etwas modifiziert nach LUDEWIG und CHANUTIN (39) und GÜRSTER (23) durchgeführt. Aus der blutleer gespülten Leber wurde 1 gr auf der analytischen Waage abgewogen. Zu 1 gr Lebergewebe wurden 9 ml o,9 %ige NaCl gegeben und im Glashomogenisator homogenisiert. Das entstandene Homogenat wurde dann bei 3ooo U/min zentrifugiert. Der Überstand stellte unser Stammhomogenat 1 : 1o dar, das entsprechend

unseren weiteren Untersuchungen mit o,9 % NaCl verdünnt wurde.

4. Enzymaktivitätsmessungen.

Im so gewonnenen Homogenatextrakt wurde die Aktivität der unten bezeichneten Enzyme bestimmt.
In der Leber wurden die Enzymaktivitäten von 4 Enzymen und der Gehalt an löslichen Proteinen bestimmt. Da die Messungen in der Regel etwa 4 Stunden dauerten, wurden das Homogenat und die Homogenatsverdünnungen in einem Eisbad aufbewahrt. Nach eigenen Vorversuchen und Ergebnissen von RIECKEN et al. (49) ist dabei der Enzymaktivitätsverlust nicht sehr groß. Bei der Durchführung der Versuche wurden Reagentien der Firma Boehringer, Mannheim, verwandt. Die optische Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde mit einem "Eppendorf"-Photometer mit angeschlossenem Direktschreiber und temperierbarem Küvettenhalter durchgeführt. (23°C)
In der Zusammenstellung der Meßmethoden richteten wir uns nach den Empfehlungen von EISCH (2o) und PROSCH (5o) und den "Biochemica Informationen Boehringer".

In dieser Arbeit wurden folgende Enzymaktivitäten bestimmt:

1. Malat Dehydrogenase (MDH)
2. Isocitrat Dehydrogenase (ICDH)
3. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)
4. Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)
5. Der Gehalt an löslichen Proteinen wurde nach der Biuretmethode bestimmt.

Ad 1.

Die Bestimmung der MDH wurde mit Testpackungen der Firma Boehringer, Mannheim, durchgeführt.
Die MDH wurde von THUNBERG, BATELLI und STERN im Jahre 1910 entdeckt und von STRAUB zuerst aus Schweineherz isoliert. (59) Die MDH katalysiert folgende Reaktion

$$\text{L-Malat} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{Oxalacetat} + NADH + H^+$$

deren Gleichgewicht bei neutralem ph weit auf der linken Seite liegt. Die pro Zeiteinheit umgesetzte Menge Oxalacetat, gemessen an der ihr äquivalenten Menge NADH, ist ein Maß für die Aktivität der Dehydrogenase. Die Testmethode folgt den Empfehlungen von BERGMEYER und BERNT (4)

Ad 2.

Auch die Bestimmung der ICDH wurde mit Testpackungen der Firma Boehringer, Mannheim, durchgeführt.
Die ICDH katalysiert die Reaktion

$$\text{Isocitrat} + NADP^+ \rightleftharpoons \alpha\text{-Ketoglutarat} + CO_2 + NADPH + H^+$$

deren Gleichgewicht weit auf der Seite von α-Ketoglutarat und NADPH liegt. Nach den Arbeiten von MARTIUS (41) und ADLER(1) über die Aufklärung der Citratumwandlung konnte OCHOA et al. (45,46,47) zeigen, daß die Dehydrierung von Isocitronensäure unter ICDH-Katalyse über das Oxalsuccinat abläuft. Das entstandene NADPH dient als Indikator für die Aktivität der ICDH.
Die von uns angewandte ICDH-Bestimmung lehnt sich an Angaben von WOLFSON und WILLIAMS-ASHMAN (65) an.

Ad 3.

Das Enzym Glutamat-Oxalacetat-Transaminase katalysiert die Reaktion

$$\text{Glutamat} + \text{Oxalacetat} \rightleftharpoons \text{Asparaginat} + \text{Ketoglutarat}$$
$$\text{Oxalacetat} + NADH + H^+ \rightleftharpoons \text{Malat} + NAD^+$$

Der NADH-Verbrauch ist prop. der gebildeteten Menge an Oxalacetat und ist somit die Meßgröße.
Unsere Bestimmung der GOT lehnt sich an Angaben von KARMEN, WROBLEWSKI und LaDUE an. (30)

Ad 4.

Im Jahre 1945 haben LENARD und STRAUB (37) die GPT zum ersten Mal isoliert. Die GPT katalysiert die Reaktion (52)

$$\text{Alanin} + \alpha\text{Ketoglutarat} \rightleftharpoons \text{Pyruvat} + \text{Glutamat}$$

Das entstandene Pyruvat wird in einer Indikatorreaktion in Lactat umgesetzt.

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}$$

Das entstandene NADH dient als Maß der Transaminierung.

Ad 5.

Proteinbestimmung

Der Gehalt an löslichen Proteinen wurde nach der Biuretmethode bestimmt. Nach GÜRSTER und SCHAUM (23,52) besitzt diese Methode eine hinreichende Genauigkeit und ist der Proteinbestimmung nach KJELDAHL ebenbürtig.

5. Berechnungen der Enzymaktivitäten.

Die gefundenen Extinktionsänderungen bei den Aktivitätsmessungen wurden nach folgender Formel umgerechnet:

$$\text{EA (mU/ml)} = \text{E/min} \times \frac{\text{Gesamt-Vol. x 1ooo x Fv}}{3{,}3 \times \text{Enzym-Vol. x d}}$$

Erläuterung:

EA	= Enzymaktivität
Gesamt-Vol.	= Summe aller Volumina des Testeinsatzes in der Küvette
1ooo	= Umrechnungsfaktor auf mU
Fv	= Verdünnungsfaktor
3,3	= Mikromolarer Extinktionskoeffizient
Enzym-Vol.	= Volumen des Homogenats bzw. dessen Verdünnung im Testeinsatz
d	= Schichtdicke der Küvette

6. Statistik.

Um die Aussagekraft unserer Ergebnisse zu erhöhen, rechneten wir unsere Aktivitätswerte auf folgende Bezugssysteme um:

1. Spezifische Aktivität = Enzymaktivität/gr Leber
2. Gesamtaktivität = Enzymaktivität/gr x Lebergewicht
3. Spezifische proteinbezogene Aktivität = $\frac{\text{Enzymaktivität/gr}}{\text{Biuretwert der Leber}}$
4. Proteinbezogene Gesamtaktivität = $\frac{\text{Enzymaktivität/gr. Lebergew.}}{\text{Biuretwert der Leber}}$
5. Spezifische Aktivität x $\frac{\text{Körpergewicht}}{\text{Lebergewicht}}$
6. Spezifische proteinbezogene Aktivität x $\frac{\text{Körpergewicht}}{\text{Lebergewicht}}$
7. Aktivität/1oo gr Körpergewicht = $\frac{\text{Enzymaktivität/gr x 1oo}}{\text{Körpergewicht}}$

Die Berechnungen wurden im "Institut für angewandte Mathematik" in Würzburg durchgeführt. +
Für alle gefundenen Werte wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet, die in Tabellen und Diagrammen dargestellt werden. Durch Varianzanalyse wurde geprüft, ob die errechneten Abweichungen der Enzymaktivitäten statistisch als gesichert angesehen werden können. In den Tabellen ist die Irrtumswahrscheinlichkeit P angegeben. Die Signifikanzschranken wurden nach den "Wissenschaftlichen Tabellen Documenta Geigy" ermittelt. (64)

7. Klassifizierung der erhobenen Befunde.

Die Gruppeneinteilung der Versuchstiere wurde nach verschiedenen Gesichtspunkten vorgenommen. Am zweckmäßigsten hat sich uns eine Einteilung nach den optischen, grobmorphologischen Gegebenheiten erwiesen. Die Gründe hierfür wurden gemeinsam mit CLAAR zusammengefaßt.(8)

Wir haben Einteilungen der Versuchstiere nach folgenden Gesichtspunkten durchgeführt:

1. Nach der Tränkungsdauer
2. Nach der durchschnittlichen Menge des inkorporierten N-Nitrosomorpholins

---

+Wir danken Herrn Dr. Knauer für seine Hilfe in mathematischen Fragen.

2. Gruppenbildung und Chemikalien.

Von den 17o Ratten, die zu unseren Versuchen herangezogen wurden, verwandten wir 15 Tiere für Vorversuche, 55 Tiere wurden als Kontrollgruppe gehalten und 1oo Tiere wurden mit dem Carcinogen N-Nitrosomorpholin getränkt. In konstanten Abständen von 1o Tagen wurden jeweils die Untersuchungen durchgeführt. An jedem Versuchstag wurden 15 Tiere zu unseren Messungen herangezogen. Im Trinkwasser von 1o Tieren unserer Versuchsgruppe war immer N-Nitrosomorpholin enthalten gewesen, die anderen 5 Tiere hatten Leitungswasser ad libitum bekommen und bildeten jeweils unsere Kontrollgruppe. Für die Versuchsgruppen wurde täglich eine Lösung, die 12 mg/1oo ml N-Nitrosomorpholin enthielt, hergestellt. Die jeweils getrunkene Menge der NNM-Lösung wurde durch Wiegen der verbleibenden Restmenge festgestellt und auf die im Käfig vorhandenen Tiere umgerechnet. Zur Orientierung über den rein toxischen Effekt des NNM auf die Leber haben wir bei wenigen Tieren 1o Tage vor Tötung das NNM aus dem Trinkwasser weggelassen. Die Zahl der Tiere ist aber so gering, daß auf diese Versuche nicht weiter eingegangen werden kann. Wir haben uns lediglich auf die Wiedergabe der Meßergebnisse beschränkt.

3. Versuchsdurchführung.

a. Vorversuche.

In Vorversuchen wurden an 15 Ratten die Einzelphasen des Hauptversuchs durchgeführt. Narkosetechnik, Operations- und Spülmethode und die Labortechnik der Enzymaktivitätsbestimmung wurden geübt. Ferner wurden die günstigsten Organhomogenatsverdünnungen für die Messung der zu untersuchenden Enzyme bestimmt.

b. Hauptversuche.

Die Tiere wurden mit Äther narkotisiert, da dieser nicht hepatotoxisch wirken soll. (33)
Im Anschluß daran wurden die Tiere gewogen und auf einem Operationsbrett fixiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde ein äthergetränkter Gazestreifen in einem Erlenmeyer-Kolben verwendet, der den Tieren über den Kopf gestülpt wurde. Die Operation der Tiere und die angewandte Methode der Leberspülung wurden etwas modifiziert nach LUDEWIG und CHANUTIN (39) und GÜRSTER (23) durchgeführt. Aus der blutleer gespülten Leber wurde 1 gr auf der analytischen Waage abgewogen. Zu 1 gr Lebergewebe wurden 9 ml o,9 %ige NaCl gegeben und im Glashomogenisator homogenisiert. Das entstandene Homogenat wurde dann bei 3ooo U/min zentrifugiert. Der Überstand stellte unser Stammhomogenat 1 : 1o dar, das entsprechend

unseren weiteren Untersuchungen mit o,9 % NaCl verdünnt wurde.

4. Enzymaktivitätsmessungen.

Im so gewonnenen Homogenatextrakt wurde die Aktivität der unten bezeichneten Enzyme bestimmt.
In der Leber wurden die Enzymaktivitäten von 4 Enzymen und der Gehalt an löslichen Proteinen bestimmt. Da die Messungen in der Regel etwa 4 Stunden dauerten, wurden das Homogenat und die Homogenatsverdünnungen in einem Eisbad aufbewahrt. Nach eigenen Vorversuchen und Ergebnissen von RIECKEN et al. (49) ist dabei der Enzymaktivitätsverlust nicht sehr groß. Bei der Durchführung der Versuche wurden Reagentien der Firma Boehringer, Mannheim, verwandt. Die optische Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde mit einem "Eppendorf"-Photometer mit angeschlossenem Direktschreiber und temperierbarem Küvettenhalter durchgeführt. (23°C)
In der Zusammenstellung der Meßmethoden richteten wir uns nach den Empfehlungen von EISCH (2o) und PROSCH (5o) und den "Biochemica Informationen Boehringer".

In dieser Arbeit wurden folgende Enzymaktivitäten bestimmt:

1. Malat Dehydrogenase (MDH)
2. Isocitrat Dehydrogenase (ICDH)
3. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)
4. Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)
5. Der Gehalt an löslichen Proteinen wurde nach der Biuretmethode bestimmt.

Ad 1.

Die Bestimmung der MDH wurde mit Testpackungen der Firma Boehringer, Mannheim, durchgeführt.
Die MDH wurde von THUNBERG, BATELLI und STERN im Jahre 1910 entdeckt und von STRAUB zuerst aus Schweineherz isoliert. (59) Die MDH katalysiert folgende Reaktion

$$\text{L-Malat} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{Oxalacetat} + NADH + H^+$$

deren Gleichgewicht bei neutralem ph weit auf der linken Seite liegt. Die pro Zeiteinheit umgesetzte Menge Oxalacetat, gemessen an der ihr äquivalenten Menge NADH, ist ein Maß für die Aktivität der Dehydrogenase. Die Testmethode folgt den Empfehlungen von BERGMEYER und BERNT (4)

Ad 2.

Auch die Bestimmung der ICDH wurde mit Testpackungen der Firma Boehringer, Mannheim, durchgeführt.
Die ICDH katalysiert die Reaktion

$$\text{Isocitrat} + NADP^+ \rightleftharpoons \alpha\text{-Ketoglutarat} + CO_2 + NADPH + H^+$$

deren Gleichgewicht weit auf der Seite von α-Ketoglutarat und NADPH liegt. Nach den Arbeiten von MARTIUS (41) und ADLER(1) über die Aufklärung der Citratumwandlung konnte OCHOA et al. (45,46,47) zeigen, daß die Dehydrierung von Isocitronensäure unter ICDH-Katalyse über das Oxalsuccinat abläuft. Das entstandene NADPH dient als Indikator für die Aktivität der ICDH.
Die von uns angewandte ICDH-Bestimmung lehnt sich an Angaben von WOLFSON und WILLIAMS-ASHMAN (65) an.

Ad 3.

Das Enzym Glutamat-Oxalacetat-Transaminase katalysiert die Reaktion

$$\text{Glutamat} + \text{Oxalacetat} \rightleftharpoons \text{Asparaginat} + \text{Ketoglutarat}$$

$$\text{Oxalacetat} + NADH + H^+ \rightleftharpoons \text{Malat} + NAD^+$$

Der NADH-Verbrauch ist prop. der gebildeteten Menge an Oxalacetat und ist somit die Meßgröße.
Unsere Bestimmung der GOT lehnt sich an Angaben von KARMEN, WROBLEWSKI und LaDUE an. (3o)

Ad 4.

Im Jahre 1945 haben LENARD und STRAUB (37) die GPT zum ersten Mal isoliert. Die GPT katalysiert die Reaktion (52)

$$\text{Alanin} + \alpha\text{Ketoglutarat} \rightleftharpoons \text{Pyruvat} + \text{Glutamat}$$

Das entstandene Pyruvat wird in einer Indikatorreaktion in Lactat umgesetzt.

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}$$

Das entstandene NADH dient als Maß der Transaminierung.

Ad 5.

Proteinbestimmung

Der Gehalt an löslichen Proteinen wurde nach der Biuretmethode bestimmt. Nach GÜRSTER und SCHAUM (23,52) besitzt diese Methode eine hinreichende Genauigkeit und ist der Proteinbestimmung nach KJELDAHL ebenbürtig.

5. Berechnungen der Enzymaktivitäten.

Die gefundenen Extinktionsänderungen bei den Aktivitätsmessungen wurden nach folgender Formel umgerechnet:

$$\text{EA (mU/ml)} = \text{E/min} \times \frac{\text{Gesamt-Vol. x 1ooo x Fv}}{3{,}3 \times \text{Enzym-Vol. x d}}$$

Erläuterung:

EA	= Enzymaktivität
Gesamt-Vol.	= Summe aller Volumina des Testeinsatzes in der Küvette
1ooo	= Umrechnungsfaktor auf mU
Fv	= Verdünnungsfaktor
3,3	= Mikromolarer Extinktionskoeffizient
Enzym-Vol.	= Volumen des Homogenats bzw. dessen Verdünnung im Testeinsatz
d	= Schichtdicke der Küvette

6. Statistik.

Um die Aussagekraft unserer Ergebnisse zu erhöhen, rechneten wir unsere Aktivitätswerte auf folgende Bezugssysteme um:

1. Spezifische Aktivität = Enzymaktivität/gr Leber
2. Gesamtaktivität = Enzymaktivität/gr x Lebergewicht
3. Spezifische proteinbezogene Aktivität = $\frac{\text{Enzymaktivität/gr}}{\text{Biuretwert der Leber}}$
4. Proteinbezogene Gesamtaktivität = $\frac{\text{Enzymaktivität/gr. Lebergew.}}{\text{Biuretwert der Leber}}$
5. Spezifische Aktivität x $\frac{\text{Körpergewicht}}{\text{Lebergewicht}}$
6. Spezifische proteinbezogene Aktivität x $\frac{\text{Körpergewicht}}{\text{Lebergewicht}}$
7. Aktivität/1oo gr Körpergewicht = $\frac{\text{Enzymaktivität/gr x 1oo}}{\text{Körpergewicht}}$

Die Berechnungen wurden im "Institut für angewandte Mathematik" in Würzburg durchgeführt. +
Für alle gefundenen Werte wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet, die in Tabellen und Diagrammen dargestellt werden. Durch Varianzanalyse wurde geprüft, ob die errechneten Abweichungen der Enzymaktivitäten statistisch als gesichert angesehen werden können. In den Tabellen ist die Irrtumswahrscheinlichkeit P angegeben. Die Signifikanzschranken wurden nach den "Wissenschaftlichen Tabellen Documenta Geigy" ermittelt. (64)

7. Klassifizierung der erhobenen Befunde.

Die Gruppeneinteilung der Versuchstiere wurde nach verschiedenen Gesichtspunkten vorgenommen. Am zweckmäßigsten hat sich uns eine Einteilung nach den optischen, grobmorphologischen Gegebenheiten erwiesen. Die Gründe hierfür wurden gemeinsam mit CLAAR zusammengefaßt.(8)

Wir haben Einteilungen der Versuchstiere nach folgenden Gesichtspunkten durchgeführt:

1. Nach der Tränkungsdauer
2. Nach der durchschnittlichen Menge des inkorporierten N-Nitrosomorpholins

---

+ Wir danken Herrn Dr. Knauer für seine Hilfe in mathematischen Fragen.

Tabelle 1 c (s. Abb. 1 c)
Spezifische proteinbezogene EA der MDH (U/gr Körpergewicht)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	1742,6	1338,4	1	-	-	-
2	2o	1231,6	513,6	2	-	-	-
3	21	1265,5	65o,7	3	-	-	-
4	18	1321,o	55o,9	4	4	1132,o	164,1
5	11	1163,7	8o3,8	5	3	1279,o	53,2
6	3	1278,8	378,5	6	3	986,6	215,1
K	55	1427,5	852,3	K	55	1427,5	852,3
	P > 0,05				P > 0,05		

Tabelle 1 d (s. Abb. 1 d)
Totale proteinbezogene EA der MDH (U/gr Protein x LG)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	18921	146o5	1	-	-	-
2	2o	16418	738o,1	2	-	-	-
3	21	16679	1o59o	3	-	-	-
4	18	18833	9365,6	4	4	26474	6492,9
5	11	1457o	13357	5	3	23781	854,2
6	3	2o613	12111	6	3	1o1o8	3524,9
K	55	23525	14345	K	55	23525	14345
	P > 0,05				P > 0,05		

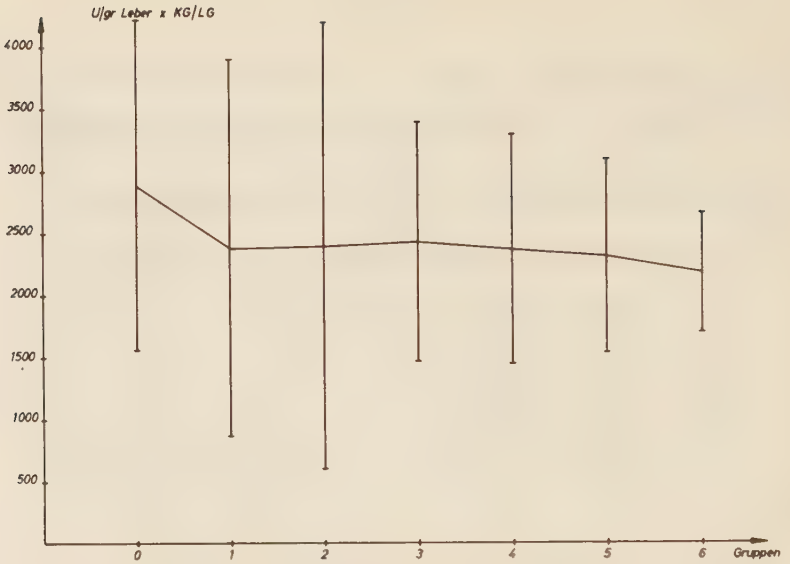


Abb. 1e Spezifische Aktivität der MDH x Körpergewicht/Lebergewicht

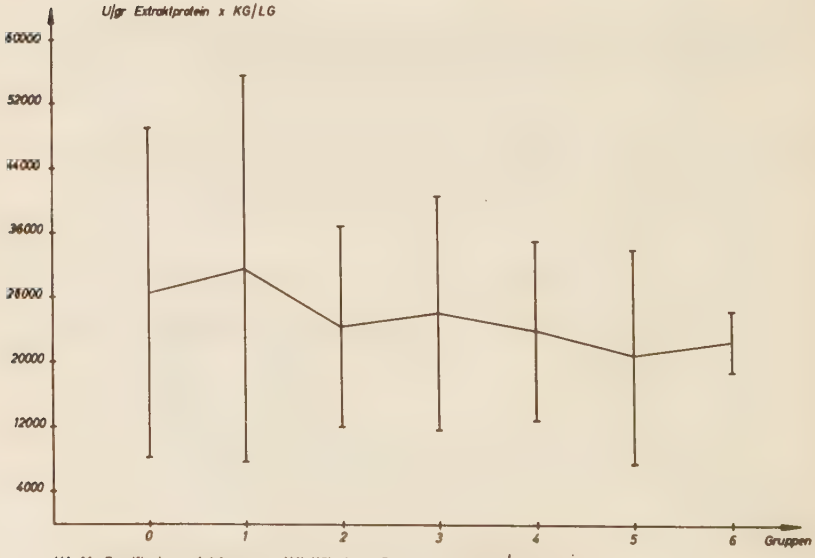


Abb. 1f Spezifische proteinbezogene Aktivität der MDH x Körpergewicht/Lebergewicht

Tabelle 1 e (s. Abb. 1 e)
Spezifische EA der MDH x KG/LG (U/gr x KG/LG)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	2421,2	1519,1	1	-	-	-
2	2o	2432,5	1794,7	2	-	-	-
3	21	2489,8	897,2	3	-	-	-
4	18	2412,9	86o,7	4	4	1472,8	44o,o
5	11	23o3,o	772,o	5	3	1894,3	192,3
6	3	2189,9	444,8	6	3	1816,o	623,3
K	55	2929,3	1313,7	K	55	2929,3	1313,7
	P > 0,05				P > 0,05		

Tabelle 1 f (s. Abb. 1 f)
Spezifische proteinbezogene EA der MDH x KG/LG
(U/gr Protein x KG/LG)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	31672	24oo5	1	-	-	-
2	2o	24324	12547	2	-	-	-
3	21	26239	14499	3	-	-	-
4	18	23993	11217	4	4	15314	2885,6
5	11	2o764	133oo	5	3	18564	2326,7
6	3	225o5	38o5,6	6	3	12287	4667,9
K	55	28599	2o5oo	K	55	28599	2o5oo
	P > 0,05				P > 0,05		

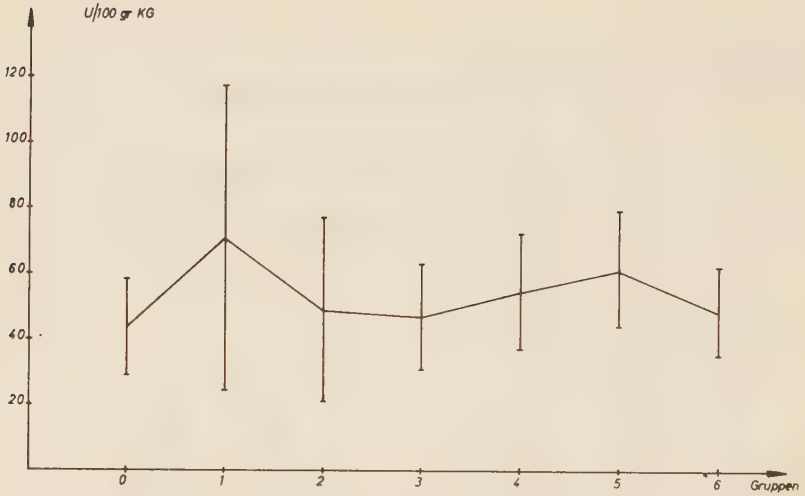


Abb. 1g Aktivität der MDH/100 gr Körpergewicht

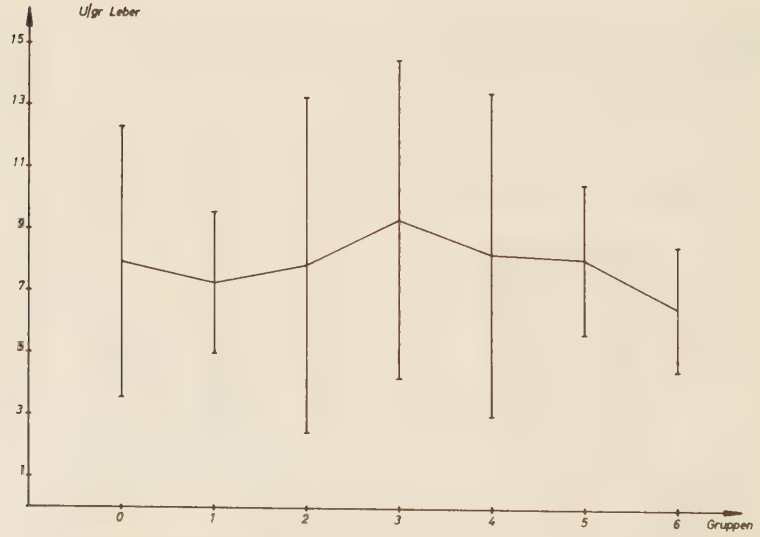


Abb. 2a Spezifische Aktivität der ICDH

Tabelle 1 g (s. Abb. 1 g)
Aktivität der MDH/1oo gr Körpergewicht (U/1oo gr KG)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	7o,26	46,67	1	-	-	-
2	2o	48,o3	28,81	2	-	-	-
3	21	46,72	16,73	3	-	-	-
4	18	54,44	17,64	4	4	36,53	15,39
5	11	61,1o	17,51	5	3	5o,95	21,82
6	3	47,98	13,82	6	3	58,o7	5,12
K	55	43,43	15,16	K	55	43,43	15,16
	P < 0,01				P > 0,05		

Tabelle 2 a (s. Abb. 2 a)
Spezifische EA der ICDH (U/gr Frischgewicht)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	7,27	2,28	1	-	-	-
2	2o	7,85	5,45	2	-	-	-
3	21	9,28	5,18	3	-	-	-
4	18	8,22	5,19	4	4	8,oo	2,64
5	11	8,o9	2,37	5	3	1o,75	3,18
6	3	6,5o	2,oo	6	3	9,83	1,15
K	55	7,93	4,1o	K	55	7,93	4,1o
	P > 0,05				P > 0,05		

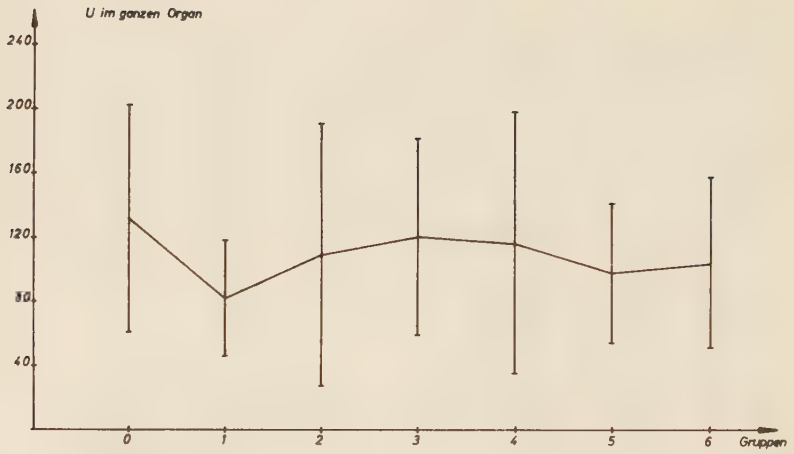


Abb. 2b Totale Aktivität der ICDH

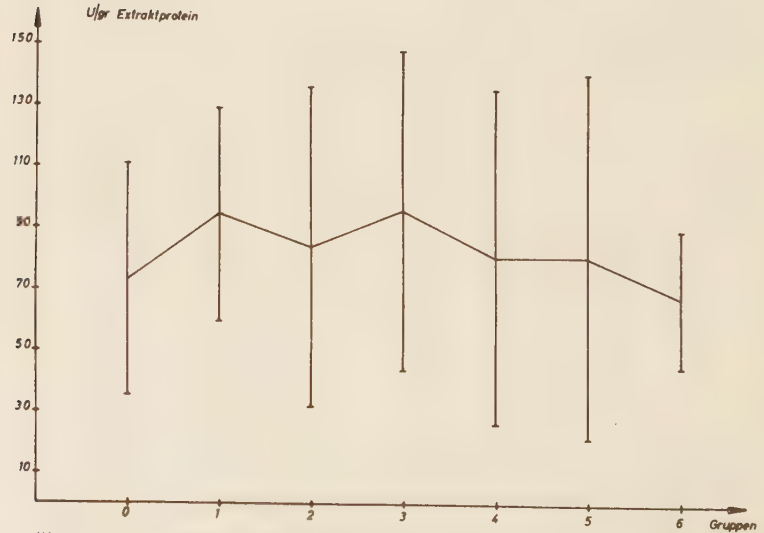


Abb. 2c Spezifische proteinbezogene Aktivität der ICDH

Tabelle 2 b (s. Abb. 2 b)
Totale EA der ICDH (U im ganzen Organ)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	82,29	36,64	1	-	-	-
2	2o	1o9,22	82,68	2	-	-	-
3	21	119,3o	61,7o	3	-	-	-
4	18	115,o3	82,48	4	4	189,66	78,67
5	11	97,54	42,33	5	3	199,73	58,o2
6	3	1o3,73	72,89	6	3	2o3,31	44,2o
K	55	131,42	68,89	K	55	131,42	68,89
	P > 0,05				P > 0,05		

Tabelle 2 c (s. Abb. 2 c)
Spezifische proteinbezogene EA der ICDH (U/gr Extraktprotein)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	94,38	34,64	1	-	-	-
2	2o	83,7o	52,66	2	-	-	-
3	21	95,2o	52,35	3	-	-	-
4	18	8o,2o	54,53	4	4	83,15	13,57
5	11	8o,21	59,56	5	3	1o3,o2	7,51
6	3	67,35	21,64	6	3	69,14	22,33
K	55	73,19	38,16	K	55	73,19	38,16
	P > 0,05				P > 0,05		

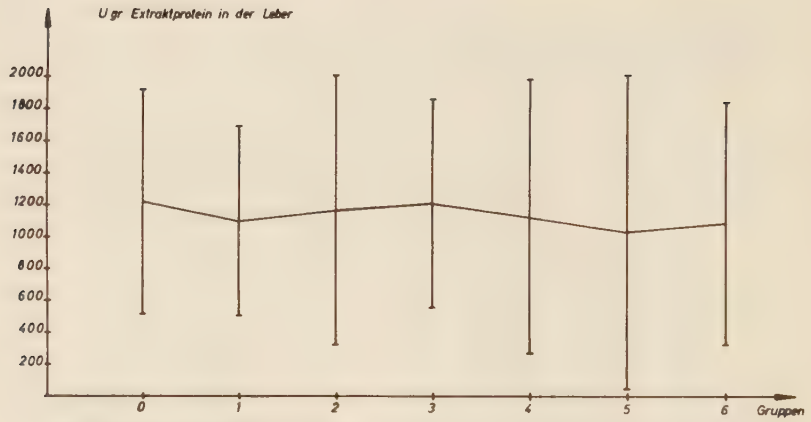


Abb. 2d Totale proteinbezogene Aktivität der ICDH

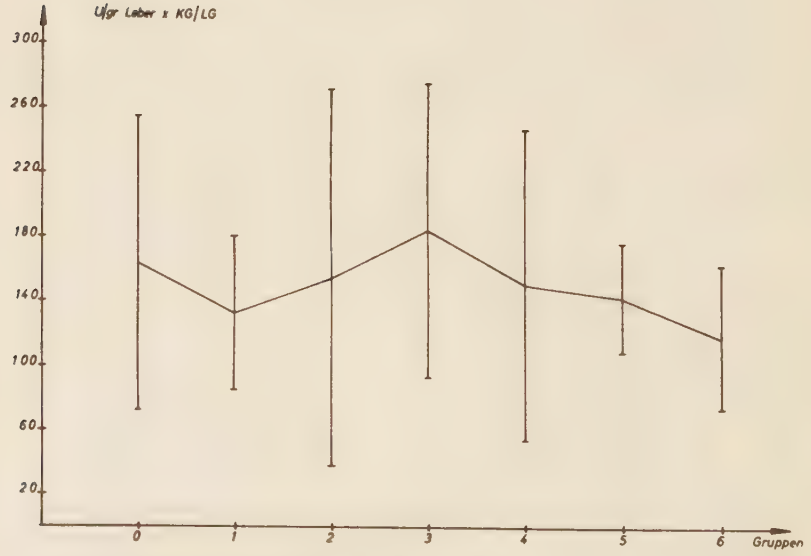


Abb. 2e Spezifische Aktivität der ICDH x Körpergewicht/Lebergewicht

Tabelle 2 d (s. Abb. 2 d)
Totale proteinbezogene EA der ICDH (U/gr Protein x LG)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	1o95,2	595,3	1	-	-	-
2	2o	1154,6	846,9	2	-	-	-
3	21	12o9,2	645,o	3	-	-	-
4	18	1128,3	857,o	4	4	196o,3	525,6
5	11	1o32,9	963,5	5	3	1915,2	128,8
6	3	1o68,9	75o,8	6	3	1436,8	565,5
K	55	1213,o	715,1	K	55	1213,o	715,1
	P > 0,05				P > 0,05		

Tabelle 2 e (s. Abb. 2 e)
Spezifische EA der ICDH x KG/LG (U/gr x KG/LG)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	132,69	46,86	1	-	-	-
2	2o	154,71	117,6o	2	-	-	-
3	21	184,72	92,11	3	-	-	-
4	18	149,95	97,58	4	4	1o5,27	21,11
5	11	142,28	34,14	5	3	152,71	2o,27
6	3	118,87	43,83	6	3	12o,21	27,14
K	55	163,o4	92,35	K	55	163,o4	92,35
	P >0,05				P > 0,05		

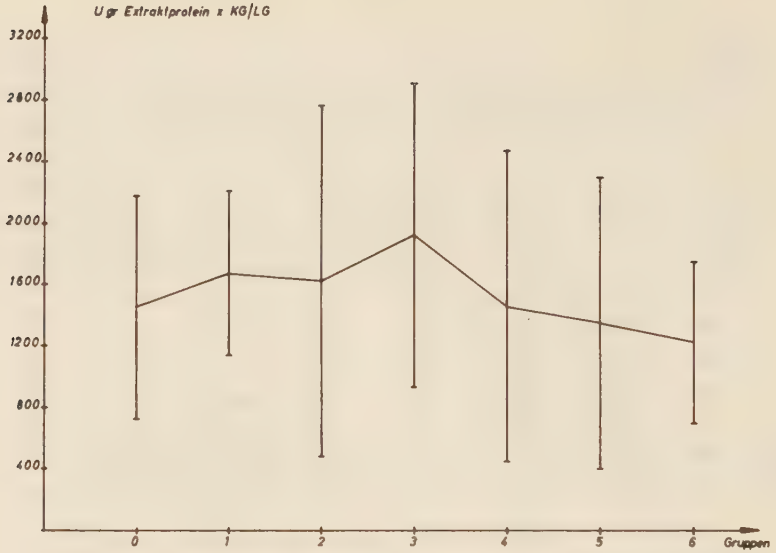


Abb. 2f Spezifische proteinbezogene Aktivität der ICDH x Körpergewicht Lebergewicht

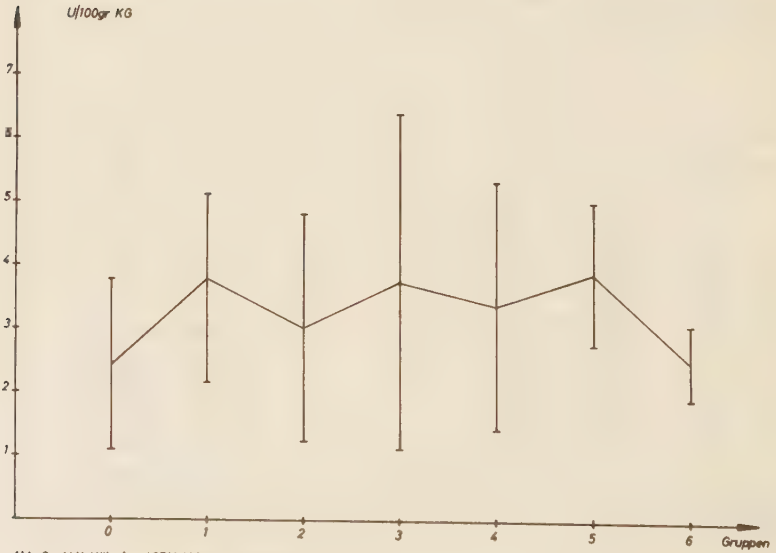


Abb. 2g Aktivität der ICDH 100gr Körpergewicht

Tabelle 2 f (s. Abb. 2 f)
Spezifische proteinbezogene EA der ICDH x KG/LG
(U/gr Protein x KG/LG

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	1677,9	525,7	1	-	-	-
2	2o	163o,2	113o,6	2	-	-	-
3	21	1916,8	987,6	3	-	-	-
4	18	1462,5	1o13,o	4	4	1114,8	12o,2
5	11	1366,8	924,4	5	3	1491,3	14o,3
6	3	1239,3	5o4,7	6	3	837,1	3o3,4
K	55	1453,2	731,o	K	55	1453,2	731,o
	P> 0,05				P> 0,05		

Tabelle 2 g (s. Abb. 2 g)
Aktivität der ICDH/1oo gr Körpergewicht (U/1oo gr KG)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	3,78	1,31	1	-	-	-
2	2o	3,o3	1,77	2	-	-	-
3	21	3,77	2,63	3	-	-	-
4	18	3,38	1,93	4	4	2,64	1,14
5	11	3,92	1,14	5	3	4,12	1,88
6	3	2,5o	o,62	6	3	3,99	o,7o
K	55	2,44	1,34	K	55	2,44	1,34
	P< 0,01				P > 0,05		

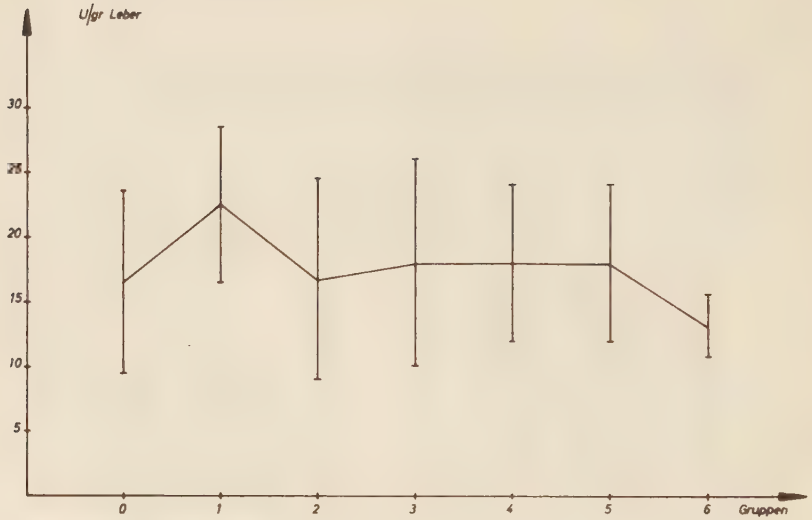


Abb. 3a Spezifische Aktivität der GOT

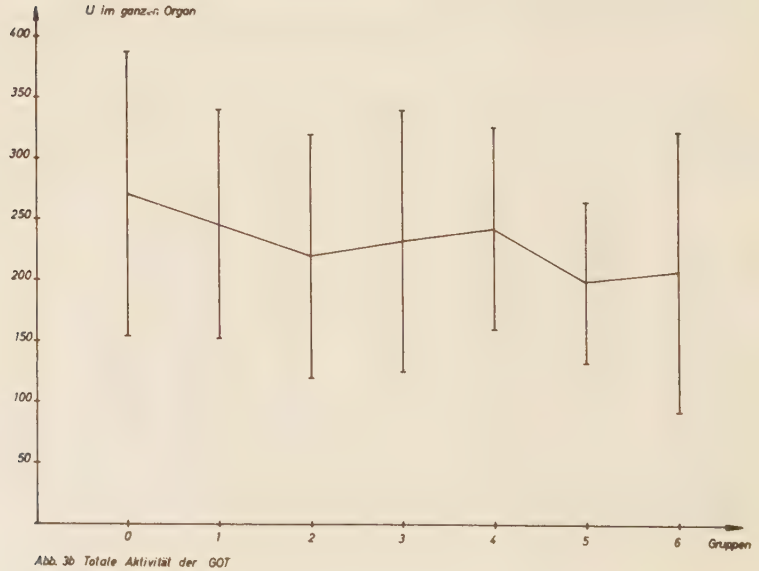


Abb. 3b Totale Aktivität der GOT

Tabelle 3 a (s. Abb. 3 a)
Spezifische EA der GOT (U/gr Frischgewicht)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	22,5o	6,31	1	-	-	-
2	2o	16,84	8,o3	2	-	-	-
3	21	17,87	8,26	3	-	-	-
4	18	18,o5	5,96	4	4	18,25	3,27
5	11	18,o4	6,14	5	3	25,75	8,13
6	3	13,33	2,o2	6	3	15,33	5,48
K	55	16,61	7,17	K	55	16,61	7,17
	P< 0,05				P > 0,05		

Tabelle 3 b (s. Abb. 3 b)
Totale EA der GOT (U im ganzen Organ)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	246,25	94,37	1	-	-	-
2	2o	22o,93	99,77	2	-	-	-
3	21	232,24	1o8,53	3	-	-	-
4	18	243,oo	82,3o	4	4	435,95	15o,31
5	11	199,58	64,o3	5	3	478,39	148,48
6	3	2o9,97	111,44	6	3	327,9o	169,o5
K	55	271,49	121,5o	K	55	271,49	121,5o
	P > 0,05				P > 0,05		

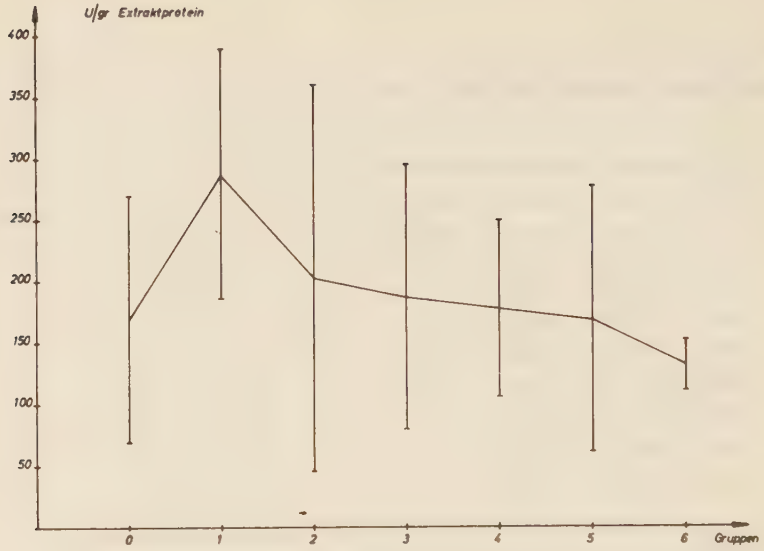


Abb. 3c Spezifische proteinbezogene Aktivität der GOT

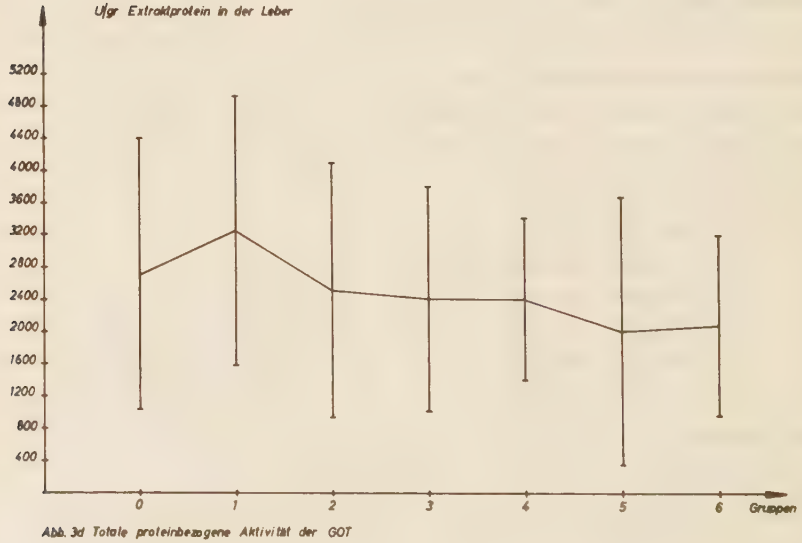


Abb. 3d Totale proteinbezogene Aktivität der GOT

Tabelle 3 c (s. Abb. 3 c)
Spezifische proteinbezogene EA der GOT (U/gr Extraktprotein)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	288,35	1o1,53	1	-	-	-
2	2o	2o3,71	156,68	2	-	-	-
3	21	187,8o	1o9,17	3	-	-	-
4	18	177,47	74,58	4	4	198,95	57,73
5	11	169,52	1o9,1o	5	3	246,19	23,o6
6	3	137,11	16,57	6	3	1o7,81	53,86
K	55	168,8o	1o3,o6	K	55	168,8o	1o3,o6
	P < 0,01				P > 0,05		

Tabelle 3 d (s. Abb. 3 d)
Totale proteinbezogene EA der GOT (U/gr Protein x LG)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	3251,2	1632,4	1	-	-	-
2	2o	2549,2	1567,7	2	-	-	-
3	21	24o9,7	1436,9	3	-	-	-
4	18	24o4,1	1o44,6	4	4	4724,3	1796,5
5	11	2o15,8	1672,4	5	3	4576,7	4o2,7
6	3	215o,1	1127,9	6	3	2325,6	1524,1
K	55	2726,3	1675,7	K	55	2726,3	1675,7
	P > 0,05				P > 0,05		

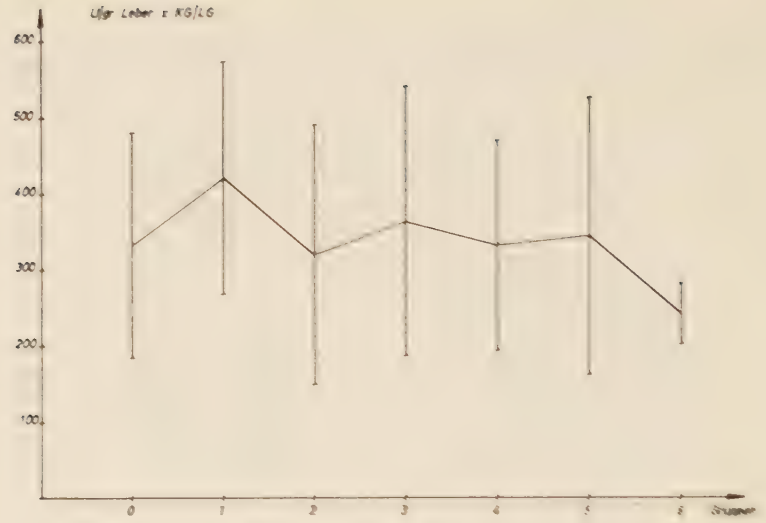


Abb. 3e Spezifische Aktivität der GOT x Körpergewicht/Lebergewicht

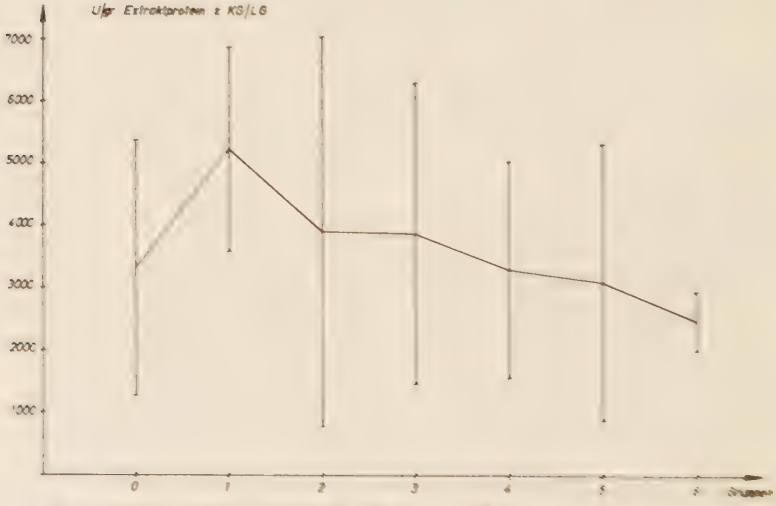


Abb. 3f Spezifische parteenbezogene Aktivität der GOT x Körpergewicht Lebergewicht

Tabelle 4 f (s. Abb. 4 f)
Spezifische proteinbezogene EA der GPT x KG/LG
(U/gr Protein x KG/LG)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	1859,o	1o86,2	1	-	-	-
2	2o	1739,4	811,8	2	-	-	-
3	21	1697,8	781,9	3	-	-	-
4	18	1269,7	676,7	4	4	1o81,7	188,4
5	11	942,8	597,8	5	3	9o2,9	86,o
6	3	768,3	264,1	6	3	682,8	281,4
K	55	1422,1	814,1	K	55	1422,1	814,1

P < 0,05 P > 0,05

Tabelle 4 g (s. Abb. 4 g)
Aktivität der GPT/1oo gr Körpergewicht (U/1oo gr KG)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	4,11	2,12	1	-	-	-
2	2o	3,39	1,34	2	-	-	-
3	21	3,26	1,36	3	-	-	-
4	18	2,84	o,58	4	4	2,5o	o,95
5	11	2,83	o,97	5	3	2,63	1,62
6	3	1,64	o,74	6	3	3,2o	o,37
K	55	2,31	1,23	K	55	2,31	1,23

P < 0,01 P > 0,05

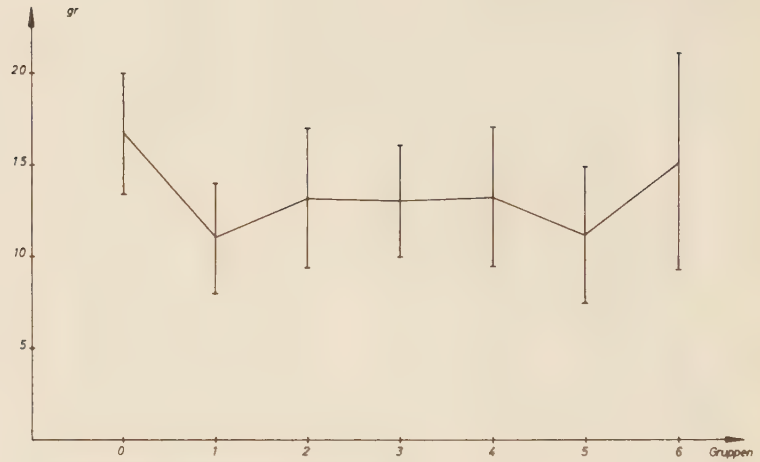


Abb. 5 Lebergewicht der Versuchstiere (gr)

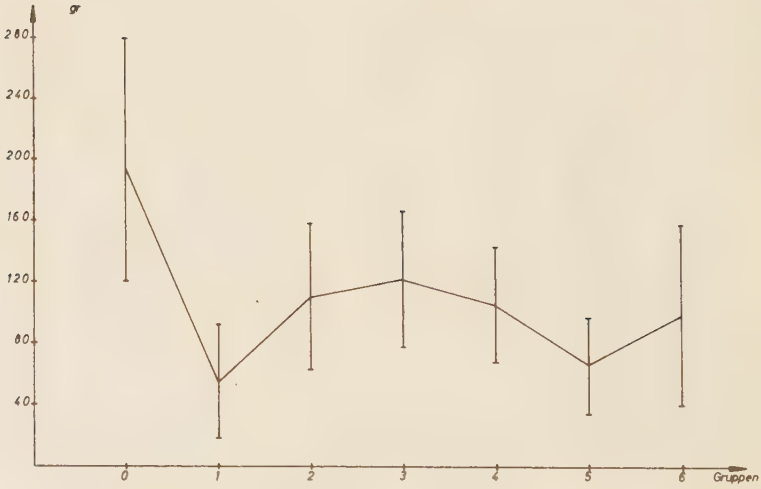


Abb. 6 Körpergewichtszunahme der Versuchstiere(gr)

Tabelle 5 (s. Abb. 5)
Lebergewicht der Versuchstiere

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	11,o3	3,25	1	-	-	-
2	2o	13,48	3,48	2	-	-	-
3	21	13,15	3,o7	3	-	-	-
4	18	13,78	3,42	4	4	23,34	4,16
5	11	11,56	3,34	5	3	18,59	1,o6
6	3	15,19	6,63	6	3	2o,62	3,19
K	55	16,61	3,43	K	55	16,61	3,43

$P < 0,01$ $P > 0,05$

Tabelle 6 (s. Abb. 6)
Körpergewichtszunahme der Versuchstiere

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	54,6	27,6	1	-	-	-
2	2o	111,7	47,6	2	-	-	-
3	21	122,1	43,5	3	-	-	-
4	18	1o4,7	38,2	4	4	172,o	32,2
5	11	66,5	31,1	5	3	131,o	46,6
6	3	118,o	38,6	6	3	1o8,o	19,2
K	55	195,6	74,o	K	55	195,6	74,o

$P < 0,01$ $P > 0,05$

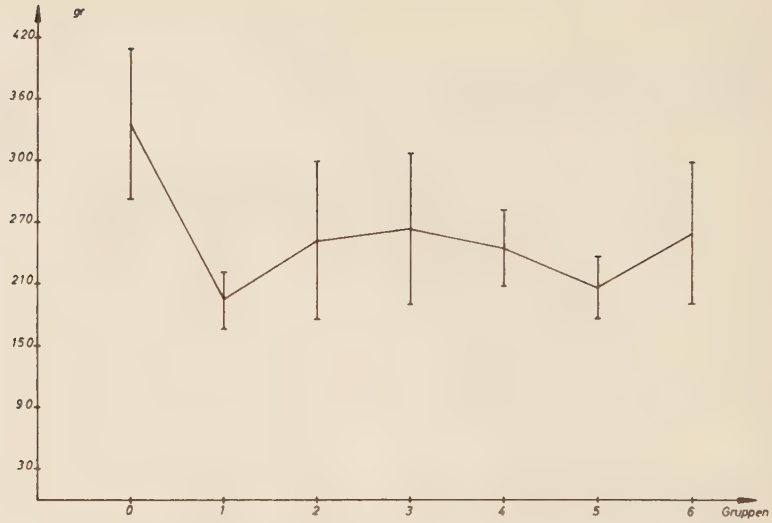


Abb. 7 Gewicht der Versuchstiere bei Tötung (gr)

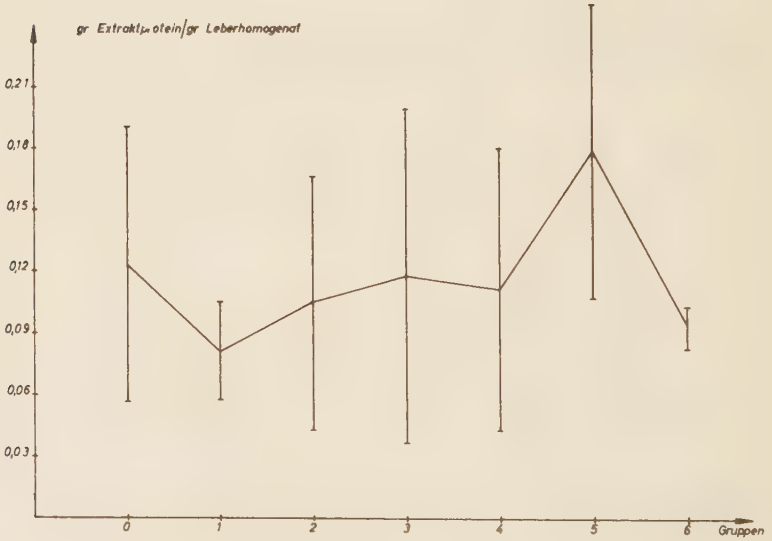


Abb. 8 Extrahierbares Protein aus dem Leberhomogenat

Tabelle 7 (s. Abb. 7)
Gewicht der Versuchstiere bei Tötung

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	194,5	27,6	1	-	-	-
2	2o	251,7	47,6	2	-	-	-
3	21	262,1	43,5	3	-	-	-
4	18	244,7	38,2	4	4	312,o	32,2
5	11	2o6,7	31,2	5	3	271,o	46,6
6	3	258,6	38,4	6	3	248,o	19,2
K	55	335,o	74,8	K	55	335,o	74,8

$p < 0,01$ $p > 0,05$

Tabelle 8 (s. Abb. 8)
Extrahierbares Protein aus dem Leberhomogenat
(gr Extraktprotein / gr Leberhomogenat)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	o,o82	o,o23	1	-	-	-
2	2o	o,1o5	o,o62	2	-	-	-
3	21	o,119	o,o82	3	-	-	-
4	18	o,116	o,o64	4	4	o,o95	o,o21
5	11	o,179	o,o69	5	3	o,1o3	o,o23
6	3	o,o97	o,oo4	6	3	o,15o	o,o39
K	55	o,123	o,o66	K	55	o,123	o,o66

$p < 0,05$ $p > 0,05$

Die Regulierbarkeiten der Aktivitäten
ausgedrückt durch die Maxima als Vielfache der Minima
(Spezifische Aktivitäten)

Kleinster gemessener Mittelwert = 1
Kontrollwert = ---

Abb. 9

V. Diskussion.

Die von uns erhobenen Befunde wurden auf 7 Bezugssysteme umgerechnet und in Tabellen und Graphiken dargestellt.

G P T

Während der Frühstadien der toxischen Schädigungen der Leber bleibt die GPT-Aktivität annähernd konstant oder steigt leicht an. Erst mit fortschreitender Cancerisierung, d. h. in den Lebern mit den mittleren bis grossen Knoten fällt die GPT-Aktivität ab. Über einen Abfall der GPT-Aktivität haben auch schon die Autoren ALLARD und DE LAMIRANDE berichtet. (2)
Über die Ursache des Abfalls der GPT-Aktivität kann man nur spekulieren. Sie könnte mit der Tumorkachexie, die sich im verminderten Gesamtgewicht der Tiere ausdrückt und dadurch einen geringeren Proteinumsatz bedingt, zusammenhängen. Dieser Abfall war in einigen Bezugssystemen signifikant.

G O T

Viel unebarakteristischer als bei der GPT war das Verhalten der GOT im Verlauf der Carcinogenese. Auffallend ist hier, daß es bei einigen Bezugssystemen zunächst zu einem Anstieg der Enzymaktivität in der frühesten Phase der toxischen Schädigung kommt. Erst bei der letzten zah-

lenmäßig kleinsten Gruppe imponiert bei einigen Bezugssystemen ein Abfall der GOT-Aktivität. Auch im Vergleich mit der Referenzgruppe ohne NNM-Behandlung ist dieser Abfall deutlich zu erkennen. In der Literatur sind bei COHEN et al. niedrige und abfallende GOT-Aktivitäten in Rattenlebern beschrieben, die während der Carcinogenese mit Buttergelb auftraten. Auch DYER et al. (19) konnten zeigen, daß die meisten Lebertumoren sehr niedrige GOT-Aktivitäten aufwiesen.

I C D H

Die ICDH ist ein Enzym des Zitronensäurecyclus. Man hätte annehmen können, daß mit zunehmender Cancerisierung, d. h. mit Umschaltung des Stoffwechsels auf Gärung, eine Veränderung der Enzyme des Zitronensäurecyclus zu Tage getreten wäre. In keinem der Bezugssysteme war aber eine statistisch signifikante Differenz zwischen den Vergleichsgruppen nachweisbar. Trotz dieser interessanten theoretischen Voraussetzung haben wir im Hinblick auf eine Carcinogenese fast keine Literaturangaben über die ICDH gefunden. Möglicherweise ist auch die ICDH-Aktivität kein begrenzender Faktor im Stoffwechselgeschehen der Leber.

M D H

Auch die MDH ist ein Enzym des Zitronensäurecyclus.

Tabelle 4 f (s. Abb. 4 f)
Spezifische proteinbezogene EA der GPT x KG/LG
(U/gr Protein x KG/LG)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	1859,o	1o86,2	1	-	-	-
2	2o	1739,4	811,8	2	-	-	-
3	21	1697,8	781,9	3	-	-	-
4	18	1269,7	676,7	4	4	1o81,7	188,4
5	11	942,8	597,8	5	3	9o2,9	86,o
6	3	768,3	264,1	6	3	682,8	281,4
K	55	1422,1	814,1	K	55	1422,1	814,1

$P < 0,05$ $P > 0,05$

Tabelle 4 g (s. Abb. 4 g)
Aktivität der GPT/1oo gr Körpergewicht (U/1oo gr KG)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	4,11	2,12	1	-	-	-
2	2o	3,39	1,34	2	-	-	-
3	21	3,26	1,36	3	-	-	-
4	18	2,84	o,58	4	4	2,5o	o,95
5	11	2,83	o,97	5	3	2,63	1,62
6	3	1,64	o,74	6	3	3,2o	o,37
K	55	2,31	1,23	K	55	2,31	1,23

$P < 0,01$ $P > 0,05$

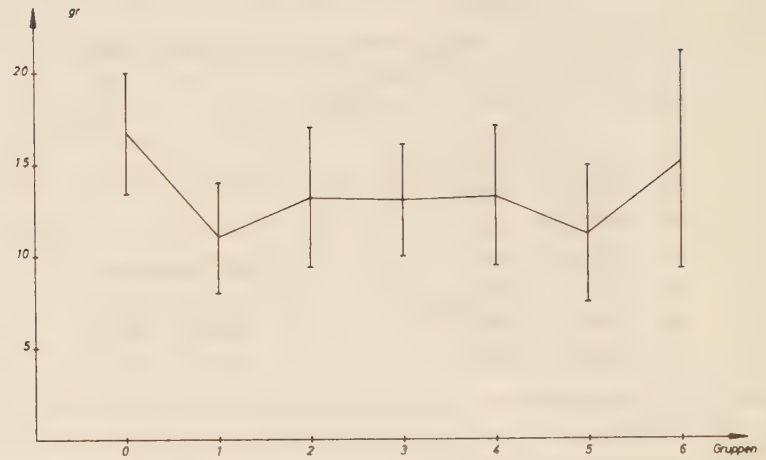


Abb. 5 Lebergewicht der Versuchstiere (gr)

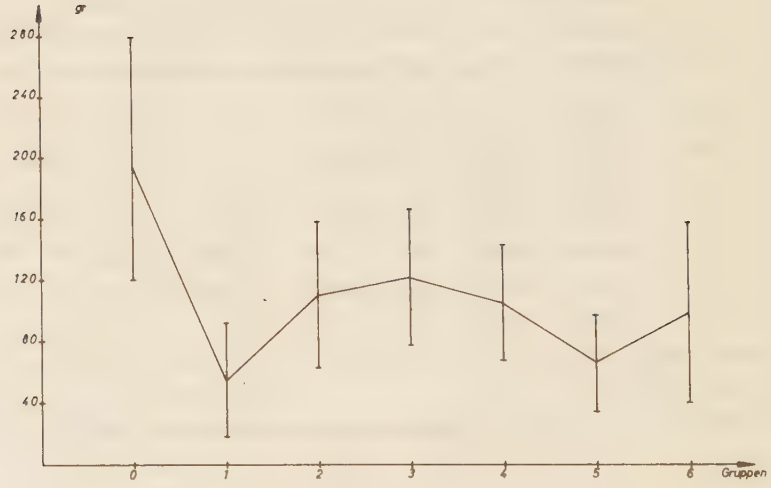


Abb. 6 Körpergewichtszunahme der Versuchstiere(gr)

Tabelle 5 (s. Abb. 5)
Lebergewicht der Versuchstiere

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	11,o3	3,25	1	-	-	-
2	2o	13,48	3,48	2	-	-	-
3	21	13,15	3,o7	3	-	-	-
4	18	13,78	3,42	4	4	23,34	4,16
5	11	11,56	3,34	5	3	18,59	1,o6
6	3	15,19	6,63	6	3	2o,62	3,19
K	55	16,61	3,43	K	55	16,61	3,43

$P < 0,01$ $P > 0,05$

Tabelle 6 (s. Abb. 6)
Körpergewichtszunahme der Versuchstiere

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	54,6	27,6	1	-	-	-
2	2o	111,7	47,6	2	-	-	-
3	21	122,1	43,5	3	-	-	-
4	18	1o4,7	38,2	4	4	172,o	32,2
5	11	66,5	31,1	5	3	131,o	46,6
6	3	118,o	38,6	6	3	1o8,o	19,2
K	55	195,6	74,o	K	55	195,6	74,o

$P < 0,01$ $P > 0,05$

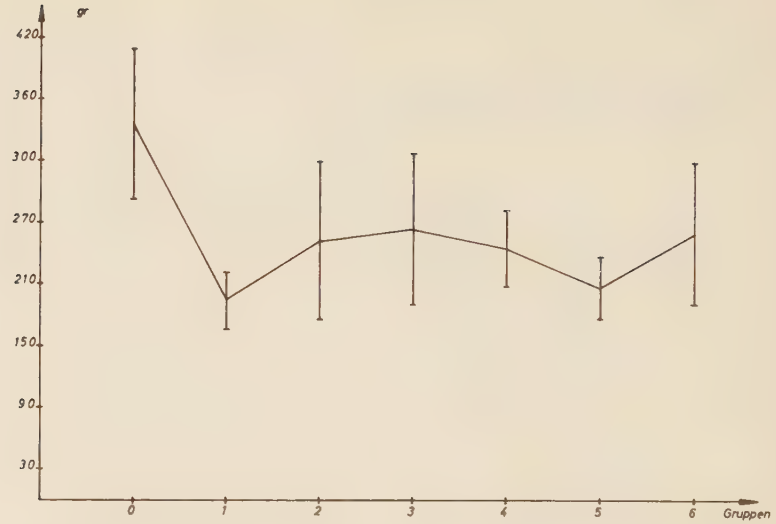


Abb. 7 Gewicht der Versuchstiere bei Tötung (gr)

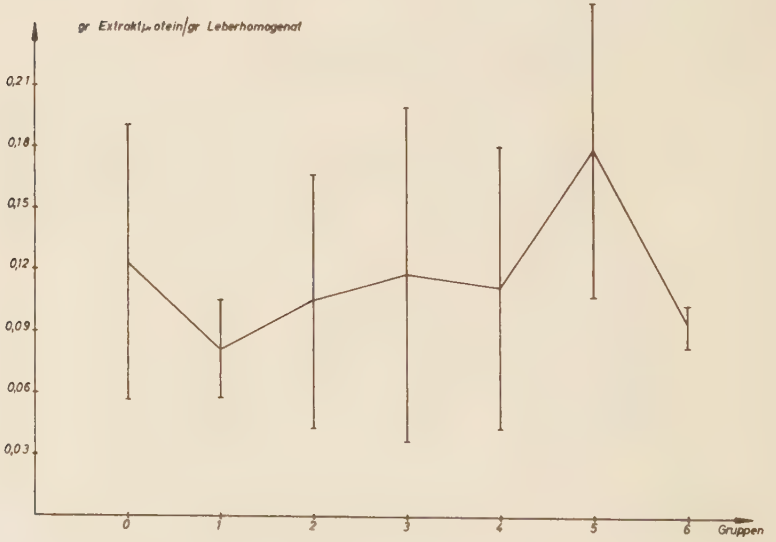


Abb. 8 Extrahierbares Protein aus dem Leberhomogenat

Tabelle 7 (s. Abb. 7)
Gewicht der Versuchstiere bei Tötung

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	194,5	27,6	1	-	-	-
2	2o	251,7	47,6	2	-	-	-
3	21	262,1	43,5	3	-	-	-
4	18	244,7	38,2	4	4	312,o	32,2
5	11	2o6,7	31,2	5	3	271,o	46,6
6	3	258,6	38,4	6	3	248,o	19,2
K	55	335,o	74,8	K	55	335,o	74,8

$p < 0,01$ $p > 0,05$

Tabelle 8 (s. Abb. 8)
Extrahierbares Protein aus dem Leberhomogenat
(gr Extraktprotein / gr Leberhomogenat)

Gr.	N	M	ST	Gr. S	N	M	ST
1	27	o,o82	o,o23	1	-	-	-
2	2o	o,1o5	o,o62	2	-	-	-
3	21	o,119	o,o82	3	-	-	-
4	18	o,116	o,o64	4	4	o,o95	o,o21
5	11	o,179	o,o69	5	3	o,1o3	o,o23
6	3	o,o97	o,oo4	6	3	o,15o	o,o39
K	55	o,123	o,o66	K	55	o,123	o,o66

$p < 0,05$ $p > 0,05$

Die Regulierbarkeiten der Aktivitäten
ausgedrückt durch die Maxima als Vielfache der Minima
(Spezifische Aktivitäten)

Abb. 9

V. Diskussion.

Die von uns erhobenen Befunde wurden auf 7 Bezugssysteme umgerechnet und in Tabellen und Graphiken dargestellt.

G P T

Während der Frühstadien der toxischen Schädigungen der Leber bleibt die GPT-Aktivität annähernd konstant oder steigt leicht an. Erst mit fortschreitender Cancerisierung, d. h. in den Lebern mit den mittleren bis grossen Knoten fällt die GPT-Aktivität ab. Über einen Abfall der GPT-Aktivität haben auch schon die Autoren ALLARD und DE LAMIRANDE berichtet. (2)
Über die Ursache des Abfalls der GPT-Aktivität kann man nur spekulieren. Sie könnte mit der Tumorkachexie, die sich im verminderten Gesamtgewicht der Tiere ausdrückt und dadurch einen geringeren Proteinumsatz bedingt, zusammenhängen. Dieser Abfall war in einigen Bezugssystemen signifikant.

G O T

Viel uncharakteristischer als bei der GPT war das Verhalten der GOT im Verlauf der Carcinogenese. Auffallend ist hier, daß es bei einigen Bezugssystemen zunächst zu einem Anstieg der Enzymaktivität in der frühesten Phase der toxischen Schädigung kommt. Erst bei der letzten zah-

lenmäßig kleinsten Gruppe imponiert bei einigen Bezugssystemen ein Abfall der GOT-Aktivität. Auch im Vergleich mit der Referenzgruppe ohne NNM-Behandlung ist dieser Abfall deutlich zu erkennen. In der Literatur sind bei COHEN et al. niedrige und abfallende GOT-Aktivitäten in Rattenlebern beschrieben, die während der Carcinogenese mit Buttergelb auftraten. Auch DYER et al. (19) konnten zeigen, daß die meisten Lebertumoren sehr niedrige GOT-Aktivitäten aufwiesen.

I C D H

Die ICDH ist ein Enzym des Zitronensäurecyclus. Man hätte annehmen können, daß mit zunehmender Cancerisierung, d. h. mit Umschaltung des Stoffwechsels auf Gärung, eine Veränderung der Enzyme des Zitronensäurecyclus zu Tage getreten wäre. In keinem der Bezugssysteme war aber eine statistisch signifikante Differenz zwischen den Vergleichsgruppen nachweisbar. Trotz dieser interessanten theoretischen Voraussetzung haben wir im Hinblick auf eine Carcinogenese fast keine Literaturangaben über die ICDH gefunden. Möglicherweise ist auch die ICDH-Aktivität kein begrenzender Faktor im Stoffwechselgeschehen der Leber.

M D H

Auch die MDH ist ein Enzym des Zitronensäurecyclus.

Die Aktivitätsänderungen der MDH waren im Verhältnis zu anderen untersuchten Enzymaktivitäten sehr gering. Nur bei einigen Bezugssystemen ließ sich eine Signifikanz feststellen. Auch für die MDH gilt, was für die ICDH gesagt wurde. Wahrscheinlich ist die MDH-Aktivität kein begrenzender Faktor, oder der Zitronensäurecyclus arbeitet vielleicht in unverminderter Art und Weise und wird durch die Cancerisierung nicht beeinträchtigt, weil ja eine gewisse Menge Energie zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels jeder einzelnen Zelle erforderlich ist. Nach den Befunden und Vorstellungen von WARBURG zeichnet sich die Tumorzelle durch einen Gärungsstoffwechsel aus. Unsere Beobachtungen lassen aber keine wesentlichen Änderungen einiger Enzyme des Zitronensäurecyclus und von mit diesem eng verknüpften Transaminierungsreaktionen erkennen. Natürlich kann man aus den wenigen untersuchten Enzymen keine zu weitreichenden Schlüsse ziehen. Möglicherweise haben wir mit unserer Auswahl gerade zwei Enzyme, die für die Regulation des Zitronensäurecyclus eine untergeordnete Bedeutung haben, herausgewählt. Trotzdem möchten wir annehmen, daß die von WARBURG beobachteten Veränderungen einen Anpassungsvorgang an eine andererwärts zu suchende Schädigung darstellen. Die Regelbreite, in der wir die Enzymaktivitäten gefunden haben, lassen sich auch bei anderen toxischen Schädigungen nachweisen. Eine zunehmende Durchsetzung der Leber mit Carcinomzellen führt zu gewissen

Abweichungen der untersuchten Enzymaktivitäten, die aber auch bei anderen Schädigungsformen der Leber etwa bei CCl_4 zu beobachten war. (5) Vielleicht ist der Zitronensäurecyclus in der toxisch geschädigten Leberzelle und auch in der Carcinomzelle von so grundlegender Bedeutung, daß eine ernsthafte Beeinträchtigung den Tod der betroffenen Zelle zur Folge hätte und eine gewisse Aktivität der am Zitronensäurecyclus beteiligten Enzyme immer aufrecht erhalten werden muß. MDH und ICDH zeigen insgesamt nur eine ganz leicht fallende Tendenz. Der statistisch signifikante Abfall der Transaminasen, die beide Metaboliten in den Zitronensäurecyclus einschleusen können, paßt zu den Vorstellungen WARBURG'S, daß die Tumorzelle bevorzugt den Gärungsstoffwechsel zur Energiegewinnung heranzieht. Der primäre Angriff der cancerisierenden Substanzen dürfte aber nicht im Bereich der von uns untersuchten Enzyme liegen.

VI. Zusammenfassung.

An 1oo Inzuchtratten vom Wistar-Stamm B 47 wurden während der Carcinogenese mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/ 1oo ml) die Enzymaktivitäten der MDH, ICDH, GOT und GPT untersucht. In konstanten Abständen von 1o Tagen wurden die einzelnen Untersuchungen durchgeführt. Wir teilten die Leberschädigungen nach grobmorphologischen Gesichtspunkten in folgende Gruppen ein:

Gruppeneinteilung:	Morphologische Befunde
0	Kontrollgruppe, Tiere ohne NNM
1	Normale Leber bei NNM, keine makroskopischen Veränderungen erkennbar.
2	Konsistenzänderung, d. h. Verhärtung der Leber.
3	Rauhe Oberfläche
4	Stecknadelkopfgroße Knoten
5	Reiskorngroße Knoten
6	Erbsen- bis bohnengroße Knoten

Bei den Enzymen des Zitronensäurecyclus MDH und ICDH war keine signifikante Veränderung der Enzymaktivitäten während der Carcinogenese feststellbar. Möglicherweise sind

diese Enzyme kein begrenzender Faktor im Stoffwechselgeschehen der Leber. Die Enzyme GOT und GPT zeigten im Verlaufe der Carcinogenese einen Aktivitätsabfall. Der Abfall der GPT war dabei besonders signifikant. Über einen Aktivitätsabfall dieser Enzyme während der Carcinogenese wird auch in der Literatur berichtet. (58) Möglicherweise hängt dieser Aktivitätsabfall mit dem tumorbedingten Verlust von Körpersubstanz zusammen.

VII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ADLER, E., v. EULER, H., GÜNTHER, G., PLASS, M.:
Isocitric dehydrogenase and glutamic acid synthesis in animal tissues.
Biochem. J. 33 (1939) 1o28 - 1o45.

2. ALLARD, C. und DE LAMIRANDE:
Behavior of Enzyms in Liver Carcinogenisis - Glutamic Dehydrogenase, Glutamic-Oxaloacetic Transaminase and Glutamic-Pyruvic-Transaminase.
Proceedings of the American Assoziation for Cancer Research. 1o - 12, 1 -2, 1959.

3. BAUER, K. H.:
Das Krebsproblem.
IV. Biochemie des Krebsgeschehens.
S. 161 (1963).

4. BERGMEYER, H. U., BERNT, E.:
Malat Dehydrogenase. Bergmeyer, H. U.,Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie Weinheim, S, 757 - 76o, 1962.

5. BOLLMANN, H. - J.:
Zahnmed. Diss. Würzburg 1971.

6. BOYLAND, E.:
The Mechanism of Tumor Induction by Aromatic Amines and other Carcinogens.
Zeitschrift f. Krebsforschung 65, 378 - 384, 1963.

7. BROCK, N., H. BARTLING and W. WILK:
Zur Ernährung der Laboratoriumstiere.
Arzneimittelforschung 5o7 - 511, 1962.

8. CLAAR, H.-P.:
Zahnmed. Diss. Würzburg 1971.

9. DANNENBERG, H.:
Stoffwechsel und endogene Krebsentstehung
Krebsforschung und Krebsbekämpfung II,
36 - 49, 1957.

1o. DANNENBERG, H.:
Beitrag zur krebserzeugenden Wirkung aromatischer Kohlenwasserstoffe und verwandter Verbindungen.
Zeitschrift für Krebsforschung 63, 1o2 - 117, 1959.

11. DONTENWILL, W. und MOHR, U.:
Die organotrope Wirkung der Nitrosamine.
Zeitschrift f. Krebsforschung 65, 166/167, 1962.

12. DOUGLAS, W. R.:
Relationships of Enzymology to Cancer: A Review
Brit. J. Cancer 27, 415 - 436, 1963.

13. DRUCKREY, H. PREUSSMANN, R., SCHMÄL, D.
und MÜLLER, M.:
Chemische Konstitution und carcinogene Wirkung bei Nitrosaminen.
Naturwissenschaften 48, 134/135, 1961.

14. DRUCKREY, H. und PREUSSMANN, R.:
Erzeugung von Lungenkrebs durch subcutane Injektion von N, N-Diamylnitrosamin an Ratten.
Naturwissenschaften 49, 111 - 112, 1962.

15. DRUCKREY, H., SCHMÄL, D. und Mitarbeiter:
Quantitative Analyse der experimentellen Krebserzeugung.
Naturwissenschaften 49, 217 - 228, 1962.

16. DRUCKREY, H., STEINHOFF, D., PREUSSMANN, R. und IVANKOVIC, S.:
Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von Methylnitroso-Harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen an Ratten.
Zeitschrift f. Krebsforschung 66, 1 - 1o, 1964.

17. DRUCKREY, H., IVANKOVIC, S., MENNEL, H. D. und PREUSSMANN, R.:
Selektive Erzeugung von Carcinomen der Nasenhöhle bei Ratten durch N, N-Di-Nitrosopiperazin, Nitrosopiperdin, Nitrosomorpholin, Methyl-allyl-, Dimethyl- und Methyl-vinyl-nitrosamin.
Zeitschrift f. Krebsforschung 66, 138 - 149, 1964.

18. DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S., SCHMÄL, D. und Mitarbeiter:
Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD Ratten.
Zeitschrift für Krebsforschung 69, 1o3 - 2o1, 1967.

19. DYER, H., GULLINO, P., ENSFIELD, B. und MORRIS, P.:
Transaminase Activities of Liver Tumors and Serum
Cancer Research 21, 1522 - 1531, 1961.

2o. EISCH, H.:
Zahnmed. Diss. Würzburg 197o.

21. GRAFFI, A.:
Betrachtungen zu den Theorien der Krebsentstehung.
Archiv für Geschwulstforschung 22, 13 - 39, 1963.

22. GRUNDMANN, E. und SIEBURG, H.:
Die Histogenese und Cytogenese des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild.
Beitr. Path. Anat. 126, S. 58 - 88, 1962.

23. GÜRSTER, A.:
Diss. Würzburg 1969.

24. HECKER, E.:
Neue biochemische Gesichtspunkte bei der Kanzerisierung .
Krebsforschung und Krebsbek. VI, 77, 1967.

25. McD. HEROLD, K.:
Effect of Route of Administration on the Carcinogenic Action of Diethylnitrosamine.
Brit. J. Cancer 18, 763 - 767, 1964.

26. HOCH-LIGETI, C., STUTZMAN, E., GRANTHAM, H. H., BROWN, T. J. and ARVIN, J. M.:
Enzyme Studies of the Liver of Rats during Carcinogenisis by Diethylnitrosamine.
Brit. J. Cancer 2o, 174 - 183, 1966.

27. HOCH-LIGETI, C., LOBL, L. T. und ARVIN, J. M.:
Effect of Nitrosamine Derivatives on Enzym Concentrations in Rat Organs during Carcinogenisis
Brit. J. Cancer 18, 271 - 284, 1964.

28. HOFFMANN, F. und GRAFFI, A.:
Nasenhöhlentumoren bei Mäusen nach percutaner Diäthylnitrosaminapplikation.
Archiv für Geschwulstforschung 23,274-288,1964.

29. HOU, C. T. und REES, K. R.:
Brit. J. Cancer 15, 624, 1961.

3o. KARMEN, A., WROBLEWSKI, F., LaDUE, J. S.:
Transaminase activity in human blood.
J. clin. Invest 34, 126, 1955.

31. KNECHT, M.:
Verteilung und Verweilzeit von Dimethylnitrosamin im Organismus der Ratte.
Zeitschrift f. Krebsforschung 69, 293 - 296, 1967.

32. KUHN, O. und KOECKE, H. U.:
Untersuchungen zur lokalen Einwirkung von Methylcholanthren auf die Leber der Maus und der Frage des primären Lebercarcinoms.
Zeitschrift f. Krebsforschung 62, 25 -37, 1957.

33. KUSCHINSKY, G. und LÜLLMANN, H.:
Lehrbuch der Pharmakologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart 146, 1967.

34. KÜNKEL, H. A.:
Über das Mutationsspektrum einiger organspezifischer cancerogener Substanzen.
Krebsforschung und Krebsbekämpfung V,
138 - 142, 1964.

35. LANGER, E.:
Kernveränderungen an Rattenlebern unter Einwirkung des cancerogenen Stoffes 4-Dimethyl-amino-azobenzol.
Zeitschrift f. Krebsforschung 52, 443, 1942.

36. LAUBER, W. und DANNENBERG, P.:
Zur Morphologie der durch p-Dimethyl-amino-azobenzol erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte.
Zeitschrift f. Krebsforschung 61, 327 - 345, 1956.

37. LENARD, P., STRAUB, F. B.:
Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged 2
S. 59, 1942.

38. LOBL, L. T. und ARVIN, J. M.:
Effect of Nitrosamine Derivatives on Enzym Concentrations in Rat Organs during Carcinogenisis.
Brit. J. Cancer 18, 271 - 284, 1964.

39. LUDEWIG, S. and A. CHANUTIN:
Distribution on enzymes in the liver of control and x-irradiated rats.
Archiv Biochem. 29, 441 - 444, 1950.

40. MAGEE, P. M. und BARNES, J. M.:
Brit. J. Cancer 10, 114, 1956.

41. MARTIUS, C., KNOOP, F.:
Der physiologische Abbau der Citronensäure.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 246, I-II, 1937.

42. MONOD, J.:
Enzymes: Units of Biological Structure and Function.
New York 1956.

43. MORRIS, H. P.:
Some Growth, Morphological, and Biochemical Characteristics of Hepatoma 5123 and other New Transplantable Hepatomas.
Fortschritte der experimentellen Tumorforschung 3, 394 - 397, 1963.

44. MÜLLER, H. A.:
Morphologische Untersuchungen zur Wirkung von N-Nitrosomorpholin auf die Lunge der Maus.
Zeitschrift f. Krebsforschung 66, 1964.

45. OCHOA, S.:
Isocitric dehydrogenase and carbon dioxide fixation.
J. biol. Chem. 159, 243 - 244, 1945.

46. OCHOA, S.:
Biosynthesis of tricarboxylic acids by dioxide fixation. III. Enzymatic mechanismus.
J. biol. Chem. 174, 133 - 157, 1948.

47. OCHOA, S., WEISZ-TABORI, E.:
Oxalosuccinic carboxylase.
J. biol. Chem. 159, 245 - 246, 1945.

48. OSSWALD, G.:
Zahnmed. Diss. Würzburg 1971.

49. RIECKEN, E. O., GOEBELL, H. und BODE, CH.:
Untersuchungen zum Einfluß von tiefen Temperaturen und Speicherdauer auf einige histochemische nachweisbare Enzymaktivitäten in Leber, Niere und Jejunum der Ratte .
Histochemie 2o, 225 - 233, 1969.

5o. PROSCH, W.:
Zahnmed. Diss. Würzburg 197o.

51. SANDER, J. und BÜRKLE, G.:
Induktion maligner Tumoren bei Ratten durch gleichzeitige Verfütterung von Nitrit und secundären Aminen.
Zeitschrift f. Krebsforschung 73, 54 -66, 1969.

52. SCHAUM, W.:
Enzymaktivitäten in der regenerierenden Rattenleber nach 2/3 Hepatektomie unter besonderer Berücksichtigung der Gluconeogenese.
Med. Dissertation, 1 - 73, 197o.

53. SCHMÄL, D., THOMAS, C. und KÖNIG, K.:
Leberkrebserzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach rectaler Applikation bei Ratten.
Zeitschrift f. Krebsforschung 65, 529 - 53o,1963.

54. SCHMÄL, D. und KRÜGER, F. W.:
Fehlen einer carcinogenen Wirkung von Dimethylthionitrosamin bei Ratten.
Zeitschrift f. Krebsforschung 73,191-192, 197o.

55. SCHMÄL, D. und PREUSMANN, R.
Cancerogene Wirkung von Nitrosodimethylamin bei Ratten.
Naturwissenschaften 46, 175, 1959.

56. SCHMÄL, D. und PREUSSMANN, R.:
Leberkrebserzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten.
Naturwissenschaften 47, 89, 196o.

57. SCHMÄL, D. und THOMAS, C.:
Erzeugung von Lungen- und Lebertumoren bei Mäusen mit N, N-Dinitrosopiperazin.
Zeitschrift f. Krebsforschung 11 - 14, 1965.

58. SCHMIDINGER, H., THEDERING, F.,SOMMER, P. und v. OLDERSHAUSEN, H. F.:
Unterschiede im Verhalten glukoplastischer Aminosäuren Enzyme in der Rattenleber.
Klinische Wochenschrift 49, 992 - 993, 1971.

59. STRAUB, B. F.:
Reinigung der Apfelsäuredehydrase und die Bedeutung der Zellstruktur in der Apfelsäuredehydrierung.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift physiol. Chem. 175, 63 - 72, 1942.

6o. TERRACINI, B., PALESTRO, G., RAMELLAGIGLIARDI,M. und MONTESANO, R.:
Carcinogenity of Dimethylnitrosamine in SWISS MICE.
Brit. J. Cancer 2o, 871 - 876, 1966.

61. THOMAS, D.:
Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte.
Zeitschrift f. Krebsforschung 64, 224-233, 1961.

62. TOTH, B., MAGEE, P. N. und SHUBIK, P.:
Carcinogenesis Study with Dimethylnitrosamine Administrated Orally to Adult and Subcutaneusly to Newborn BALB/c Mice.
Cancer Research 24, 1712 - 1716, 1964.

63. WEBER, G. HENRY, M. C., WAGLE, S. R. und WAGLE, D. S.:
Correlation of Enzyme Activities and Metabolic Pathways with Growth Rate of Hepatomas.
ADVANCES in Enzym Regulation 2, 338 - 34o, 1964.

64. Wissenschaftliche Tabellen,
Documenta Geigy, J. R., Geigy A. G.

65. WOLFSON, S. K., WILLIAMS-ASHMAN, H. G.:
Proc. Soc. Biol. Med. 96, 231, 1957.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Privat-Dozent Dr. med. H. H a u g für die freundliche Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft, seine vielen Ratschläge und für die Übernahme des Referates.

Herrn Professor Dr. med. H. F r a n k e danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die Übernahme des Korreferates.

Für die Hilfe in mathematischen Fragen danke ich Herrn Dr. B. K n a u e r .

L E B E N S L A U F

Am 17.2.1942 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Dr. Artur Brünger und seiner Ehefrau Elfriede Brünger, geb. Vocke, in Herford/Westfalen geboren. Nach dem Besuch der Volks- und Realschule in Löhne war ich von 1955 - 1960 Schüler des Max-Planck-Gymnasiums in Bielefeld. Von 1960 - 1963 besuchte ich das Nordsee-Gymnasium-Langeoog. Im April 1963 bestand ich die Reifeprüfung. Es folgte die Wehrdienstzeit von 1963 - 1964. Im Sommersemester 1964 begann ich mit dem Studium der Zahnheilkunde in Würzburg. 1968 legte ich die zahnärztliche Vorprüfung und im Februar 1971 die zahnärztliche Prüfung ab.
Im Augenblick bin ich als Assistent in einer zahnärztlichen Praxis tätig.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation selbständig angefertigt, dabei keine anderen Hilfsmittel als die im Quellen- und Literaturverzeichnis und in den Anmerkungen genannten benutzt, alle aus Quellen- und Literaturverzeichnis ganz oder annähernd entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und einzeln auch die Fundstellen nachgewiesen habe.
Ich habe die Dissertation noch keiner anderen Fakultät vorgelegt mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erwerben.

Jürgen Brünger

Löhne, den 15.12.1971

Schnelldruck-Böhler, 87 Würzburg, Seilerstr. 10

Schnelldruck-Böhler, 87 Würzburg, Seilerstr. 10